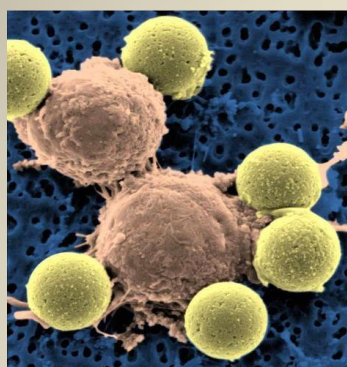




UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Departamento de
Bioquímica, Biología
Molecular e Inmunología

Facultad de Medicina

IMPLICACIÓN DE PERFILES INMUNO-GENÉTICOS DE LA RESPUESTA INMUNE CITOTÓXICA EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y/O EVOLUCIÓN DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL SUR DE ESPAÑA

GEMA DURÁN OGALLA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

IMPLICACIÓN DE PERFILES INMUNO-GENÉTICOS DE LA RESPUESTA INMUNE CITOTÓXICA EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y/O EVOLUCIÓN DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL SUR DE ESPAÑA

Gema Durán Ogalla

Málaga, año 2016


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Gema Durán Ogalla

 <http://orcid.org/0000-0003-0745-047X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



A mi marido, a mis padres y a mis hermanas

AGRADECIMIENTOS

No hubiera imaginado hace unos meses que llegaría este momento. Una travesía que comenzó hace un par de años, y que como en las grandes batallas que han surcado nuestros mares, ha pasado por momentos de gloria y otros cercanos a la derrota, casi de estar a la deriva, de no encontrar el faro que la guíe, pero que finalmente ha llegado a su puerto, a su destino, y todo ello gracias a la ayuda de una magnífica “tripulación” de viaje.

A mis directores de tesis, los doctores Manuel Benavides Orgaz y Rocío Lavado Valenzuela, por haber confiado en mí para este proyecto, por la ayuda prestada no sólo en conocimientos científicos, también en lo personal y humano, por animarme en los momentos difíciles y felicitarme las victorias.

A mi tutor, el Dr. Abelardo Caballero González, por hacerme comprender y recordar el maravilloso mundo de la inmunología y darle una visión clínica y actual a este proyecto.

A mi amiga y gran profesional Marta Gómez Torres, que además de organizar y ocuparse de la extracción de muestras para esta tesis, me ha acompañado en esas largas tardes completando la base de datos.

Al Dr. José Manuel Jerez Aragonés, profesor de la ETSI Informática de la Universidad de Málaga, por su buena disposición y su valiosa aportación en el análisis *cluster* de este proyecto.

A mis compañeros del servicio de Oncología, que me han acompañado en el camino, compartiendo su tiempo y opiniones, escuchando mis dudas y quejas.

A los pacientes con cáncer de mama que han donado desinteresadamente muestras para este proyecto y que constituyen el objetivo final de este trabajo.

Al Hospital Regional Universitario Carlos Haya, especialmente a la Sección de Oncología Médica y al Servicio de Inmunología, y a la fundación IMABIS, por haber puesto a mi disposición todos los recursos necesarios para que pudiera desarrollar satisfactoriamente esta tesis doctoral.

A mis amigos, compañeros inseparables, aquellos que siempre han estado ahí, a pesar de mis escasas salidas, de no estar en sus celebraciones, de perderme momentos irrepetibles, y sin embargo no han dejado de arroparme, de animarme y acompañarme en este viaje, a todos ellos muchas gracias.

A mi familia, por el cariño, la comprensión y el apoyo que me han brindado toda la vida, que ha hecho posible que llegue a ser lo que soy, en especial a mis padres y hermanas. Y como no a mi marido, el timón de esta travesía, que me ha hecho llevar a “buen puerto” este proyecto. A él le debo que esta tesis vea la luz, por animarme en los momentos donde yo he querido bajarme del barco y por llevarme de la mano y acompañarme en el viaje.

Y sé que este viaje no es el último, me espera el más importante, el de ser madre. A ella, que aun sin conocerla ya me ha robado el corazón y se ha convertido en el centro de mi vida. Gracias Valeria por compartir este momento con nosotros.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	Epidemiología y etiopatogenia del cáncer de mama en España.	3
2.	Cáncer de mama y subtipos moleculares.	6
3.	Inmunología tumoral.	7
3.1.	Introducción.	7
3.2.	Teoría de la inmunovigilancia.	8
3.3.	Eliminación tumoral.	11
3.4.	Escultura inmunológica e <i>immunoediting</i> .	14
3.5.	Inmunovigilancia/ <i>immunoediting</i> en humanos.	17
4.	Moléculas implicadas en la respuesta inmune: Complejo Mayor de Histocompatibilidad y receptores NKG2D y CTLA-4.	19
4.1.	Un poco de historia.	19
4.2.	Genética del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.	20
4.3.	Antígenos HLA clase I y II.	21
4.3.1.	Estructura.	21
4.3.2.	Polimorfismo del sistema HLA clase I y II.	23
4.3.3.	Funciones de las moléculas HLA clase I y II.	24
4.3.4.	Asociación HLA y enfermedad.	26
4.4.	Familia de genes MIC.	27
4.4.1.	Estructura de los genes MICA.	28
4.4.2.	Polimorfismos de MICA.	29
4.4.3.	Función biológica de MICA.	30
4.4.4.	Mica en la inmunología tumoral.	32
4.5.	Moléculas LMP y TAP. Procesamiento antigénico.	32
4.5.1.	Procesamiento y presentación por MHC clase I: implicación de LMP y TAP.	33
4.5.1.1.	Proteosomas y generación de péptidos.	34
4.5.1.2.	Transporte peptídico y ensamblaje dentro del retículo endoplásmico.	36
4.6.	Otras moléculas relacionadas con el sistema inmune y el MHC: NKG2D y CTLA-4.	39
4.6.1.	El receptor NKG2D.	39
4.6.1.1.	NKG2D e inmunidad antitumoral.	40
4.6.1.2.	Mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL.	42
4.6.2.	El receptor CTLA-4.	43
5.	Sistema inmune y cáncer de mama.	46

II.	OBJETIVOS	51
1.	Objetivo principal.	53
2.	Objetivos secundarios.	53
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	55
1.	Población de estudio.	57
1.1.	Pacientes.	57
1.2.	Controles.	57
1.3.	Tamaño muestral.	57
2.	Material.	57
2.1.	Equipamiento.	57
2.2.	Material fungible.	58
2.3.	Soluciones.	59
2.4.	Softwares y programas específicos.	59
3.	Métodos.	60
3.1.	Obtención y almacenamiento de las muestras de sangre periférica.	60
3.2.	Extracción del ADN.	60
3.3.	Cuantificación del ADN.	60
3.4.	Preparación de las muestras de ADN.	60
3.5.	Determinación de las variantes alélicas de los genes de clase I (HLA-B*) y clase II (HLA-DBR*).	61
3.5.1.	Amplificación.	62
3.5.2.	Desnaturalización.	63
3.5.3.	Hibridación.	63
3.5.4.	Etiquetado.	64
3.5.5.	Adquisición.	64
3.6.	Alelos del microsatélite de la región transmembrana de MICA.	64
3.6.1.	Preparación de la PCR.	65
3.6.2.	Análisis del microsatélites.	66
3.7.	Determinación de las variantes alélicas de los genes LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2.	68
3.7.1.	Preparación de la PCR.	69
3.7.2.	Lectura de los resultados.	71
3.8.	Determinación de la variante polimórfica del gen NKG2D.	71
3.8.1.	Preparación de la PCR.	71
3.8.1.1.	Electroforesis en gel de agarosa.	73
3.8.2.	Digestión enzimática.	74
3.8.3.	Lectura.	75
3.9.	Determinación de las variantes polimórficas de CTLA-4.	75
3.9.1.	Preparación de la PCR.	75

3.9.2. Digestión enzimática.	78
3.9.3. Lectura.	79
4. Análisis estadístico de los resultados.	79
 IV. RESULTADOS	 83
1. Análisis descriptivo de las variables clínicas en pacientes.	85
2. Análisis descriptivo y comparativo de las variables moleculares en pacientes y controles.	92
2.1. Distribución de los alelos de HLA clase I (HLA-B*) y clase II (HLA-DRB1*).	92
2.1.1. Distribución de los alelos de clase I HLA-B*.	92
2.1.2. Distribución de los alelos de clase II HLA-DRB1*.	94
2.2. Distribución de los alelos del exón 5 de MICA.	95
2.3. Distribución de las variantes alélicas de LMP2 y LMP7.	96
2.3.1. Distribución de las variantes alélicas de LMP2.	96
2.3.2. Distribución de las variantes alélicas de LMP7.	97
2.4. Distribución de las variantes alélicas de TAP1 y TAP2.	99
2.4.1. Distribución de las variantes alélicas de TAP1.	99
2.4.2. Distribución de las variantes alélicas de TAP2.	102
2.5. Distribución de los alelos NKG2D.	107
2.6. Distribución de las variantes alélicas de CTLA-4.	109
3. Análisis comparativo de los haplotipos LMP7/TAP 2.1 entre pacientes y controles.	113
4. Análisis multivariante de los polimorfismos genéticos entre pacientes y controles.	114
5. Análisis comparativo de los diferentes polimorfismos genéticos en paciente en función de las variables clínicas de la enfermedad.	114
6. Análisis de parámetros de eficacia de tratamiento en función de los polimorfismos genéticos analizados.	130
7. Análisis biclustering de variables clínicas en pacientes con cáncer de mama y polimorfismos genéticos.	131
 V. DISCUSIÓN	 135
 VI. CONCLUSIONES	 149
 VII. ABREVIATURAS	 153
 VIII. BIBLIOGRAFIA	 157
 IX. ANEXOS	 185

I. INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología y etiopatogenia del cáncer de mama en España.	3
2. Cáncer de mama y subtipos moleculares.	6
3. Inmunología tumoral.	7
3.1. Introducción.	7
3.2. Teoría de la inmunovigilancia.	8
3.3. Eliminación tumoral.	11
3.4. Escultura inmunológica e <i>immunoediting</i> .	14
3.5. Inmunovigilancia/ <i>immunoediting</i> en humanos.	17
4. Moléculas implicadas en la respuesta inmune: Complejo Mayor de Histocompatibilidad y receptores NKG2D y CTLA-4.	19
4.1. Un poco de historia.	19
4.2. Genética del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.	20
4.3. Antígenos HLA clase I y II.	21
4.4. Familia de genes MIC.	27
4.5. Moléculas LMP y TAP. Procesamiento antigénico.	32
4.5. Otras moléculas relacionadas con el sistema inmune y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad: NKG2D y CTLA-4.	39
5. Sistema inmune y cáncer de mama.	46

1. Epidemiología y etiopatogenia del cáncer de mama en España.

Actualmente, el cáncer es la primera causa de muerte en países en vías de desarrollo, y la segunda en países desarrollados (después de las enfermedades cardiovasculares). Según datos de GLOBOCAN 2008, se estima que 12,7 millones de casos y 7,6 millones de muertes por cáncer tuvieron lugar en el año 2008. De ellos, un 56% de los casos y un 64% de las muertes ocurrieron en países en vías de desarrollo (Ferlay J et al., 2010).

El cáncer de mama (CM) representa hoy en día uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, debido al elevado número de casos nuevos que se diagnostican cada año, así como a la mortalidad que ocasiona. Representa el tumor más frecuente en la mujer con una estimación cercana a 1,38 millones de casos nuevos al año a nivel mundial (23% de todos los casos de cáncer diagnosticados) y una mortalidad cercana al 14% (458.000 defunciones del total relacionadas con cáncer).

La incidencia sigue siendo mayor en países industrializados, con un incremento en las últimas dos décadas (Norte-Centro de Europa, Australia, Nueva Zelanda, Norte América), seguidos de América del Sur, Caribe y Norte de África, y cifras más bajas en África sub-Sahariana y Asia. Los factores que contribuyen a esta variación entre regiones, residen en diferencias en factores reproductivos y hormonales (historia larga menstrual, nuliparidad, uso de terapia hormonal sustitutiva posmenopáusica, uso de anticonceptivos orales y aumento de la edad del primer embarazo), así como en el desigual acceso a programas de screening-detección precoz de CM. Por el contrario, la mortalidad ha descendido en los últimos 25 años debido al diagnóstico en estadios iniciales con la implantación de programas de detección precoz, y a los avances y mejoras en el tratamiento de esta neoplasia (Jemal A et al., 2011).

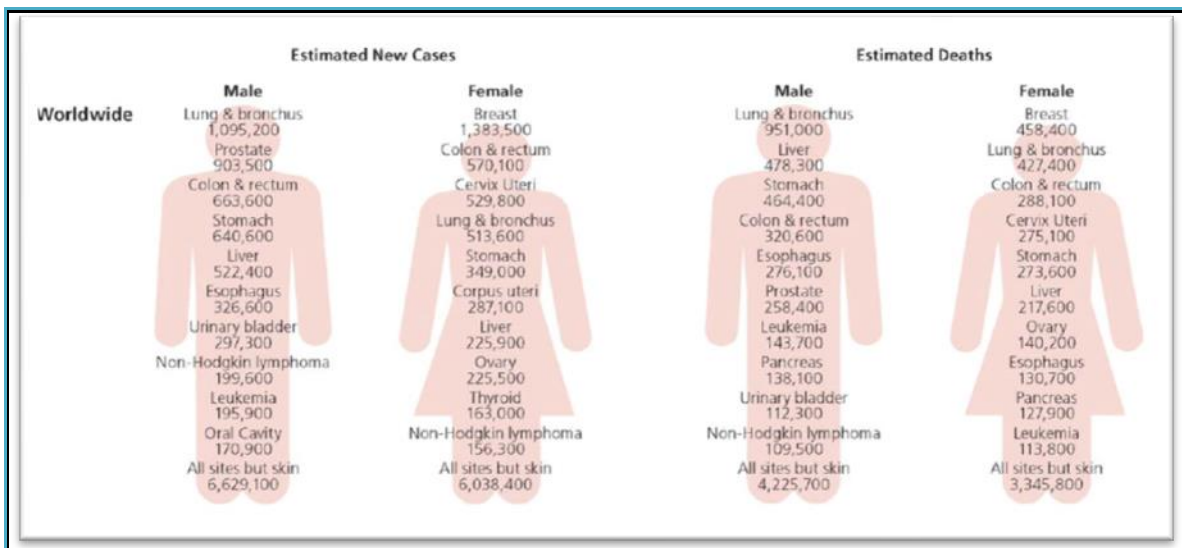


FIGURA 1: Estimación de casos nuevos de cáncer y defunciones por localización en mujeres a nivel mundial. GLOBOCAN 2008 (Jemal A et al., 2011).

Implicación de perfiles immuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

En España, como en casi todos los países desarrollados, el CM representa la neoplasia más frecuente en la mujer y la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina, sobre todo en mujeres entre 35 y 45 años, con más de 25000 casos nuevos anuales (29%) y 6000 defunciones (15,5%). La mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y 65 años. La probabilidad de desarrollar un CM a lo largo de la vida se encuentra entre el 8-10% (es decir, que una de cada 10-12 mujeres españolas va a desarrollar un CM) (SEOM 2014). Aun así, la incidencia y mortalidad del CM en España se encuentra entre las más bajas a nivel de Europa. Igualmente, la supervivencia para este tumor, está por encima de la media Europea, con una tasa de supervivencia a los 5 años superior al 83% (siendo la media Europea entre 76-80%) (De Angelis R et al., 2014).

La etiopatogenia del CM es desconocida y probablemente multifactorial. Entre los factores de riesgo clásicos destacan (Senkus E et al., 2013; Madigan MP et al., 1995):

- Edad y género: es un tumor 100 veces más frecuente en mujeres que en hombres y aumenta exponencialmente con la edad hasta los 50 años.
- Historia personal de CM: haber padecido un CM aumenta el riesgo de desarrollo de la mama contralateral (1% al año en mujeres premenopáusicas y del 0,5% al año para posmenopáusicas).

Las lesiones no proliferativas (cambios fibroquísticos, papilomas, fibroadenomas) no están asociadas con un aumento del riesgo de CM. Este riesgo sí está aumentado en las lesiones proliferativas, ligeramente (RR 1,3-2) en las que no presentan atipia (fibroadenoma complejo, hiperplasia, papilomas intraductales) y más evidente (RR 4-6) en lesiones con atipia (hiperplasia lobulillar o ductal con atipia), siendo todavía mayor si son lesiones multifocales.

- Historia familiar y factores genéticos: solo entre un 15-20% de los casos tienen historia familiar. Tener un familiar de primer grado con CM duplica el riesgo. Se estima que el 5-10% de los casos se deben a mutaciones en la línea germinal de los genes BRCA1 y BRCA2. Ambos son genes supresores de tumores localizados en los cromosomas 17 y 13 respectivamente, de herencia autosómica dominante. En estos casos, hablamos de CM hereditario. Generalmente se reconocen por aparecer a edades muy tempranas y/o estar asociados a antecedentes familiares muy importantes. Otros genes de alta penetrancia que suponen mayor riesgo son p53 (síndrome de Li-Fraumeni), PTEN (síndrome de Cowden) y STK1 (síndrome de Peutz-Jeghers) entre otros. No obstante, la mayoría de los CM se desarrollan en mujeres sin antecedentes familiares y se consideran por ello esporádicos.
- Factores dietéticos y estilo de vida: las diferencias geográficas en la incidencia del CM están en probable relación con la dieta y el estilo de vida. El sobrepeso parece aumentar el riesgo de CM en mujeres posmenopáusicas, sin embargo, en mujeres premenopáusicas parece tener un efecto contrario, siendo menor el riesgo de CM en

mujeres con un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 31 kg/m². La actividad física parece aportar un modesto efecto protector. Entre los factores dietéticos cabe destacar el aumento de riesgo de CM con sobreexpresión de receptores hormonales asociado al consumo de alcohol, así como el posible aumento de riesgo relacionado con el consumo de grasas.

- Factores hormonales: la relación entre niveles estrogénicos y el desarrollo de CM está claramente establecida. La exposición prolongada a alta concentración de estrógenos aumenta el riesgo de CM. Se consideran factores de riesgo: menarquia precoz (antes de los 12 años), menopausia tardía, nuliparidad, tratamiento hormonal sustitutivo. Entre los factores protectores podemos destacar: lactancia materna y primer parto a edad temprana (Stuebe AM et al., 2009). El riesgo asociado al uso de anticonceptivos es todavía controvertido.
- Factores ambientales y ocupacionales: las radiaciones ionizantes, fundamentalmente en la infancia y la adolescencia, son factores de riesgo para el desarrollo de CM. En cuanto a los factores ocupacionales, se ha encontrado asociación entre ciertas profesiones—sanitarios, farmacéuticos, profesores, telefonía y radio, industria química—y el CM, aunque es difícil separar la profesión de los hábitos de vida y el nivel social.
- Bifosfonatos: varios estudios han demostrado un papel protector de los bifosfonatos orales (Goss PE et al., 2011). Debido a que la densidad ósea baja se relaciona con un menor riesgo de CM, no está claro si el efecto protector de los bifosfonatos es real o existe un factor de confusión relacionado con la densidad ósea.

Los factores de riesgo clásicos explican menos del 50% de los casos observados, siendo además la mayoría de ellos no modificables. Por otra parte, el control de los modificables no produciría una franca y significativa disminución de su incidencia, por lo que por ahora no existe una clara posibilidad de evitar su aparición (Madigan MP et al., 1995).

Por el contrario, la detección precoz ha demostrado ser un método eficaz para disminuir la mortalidad. A pesar de ciertas controversias, los resultados de los estudios realizados hasta el momento son consistentes. De la mayoría de ellos se concluye que la realización de mamografías periódicas conduce a una disminución del riesgo de morir por CM (Hakama M et al., 2008; Shopper D y de Wolf C, 2009; Gabe R y Duffy SW, 2005).

Sobre esta base, existe un consenso generalizado en la conveniencia de la puesta en marcha de programas de cribado de carácter poblacional. Entre otros organismos, la Unión Europea, en el año 2003, estableció sus recomendaciones de cribado poblacional de cáncer, incluyendo entre ellos el de CM mediante mamografía bienal en las mujeres de 50 a 69 años.

Prácticamente todos los países europeos, aun con modelos organizativos diferentes, han puesto en marcha programas de cribado. En España, la Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de Salud del año 2009 también recomienda la realización de este cribado

estableciendo los criterios mínimos para su puesta en marcha y desarrollo (Ministerio de Sanidad y Política Social, 2010).

En este momento, todas las mujeres españolas entre 50 y 69 años tienen acceso a un programa de cribado de CM. Hace ya más de 20 años, con el inicio en España de los primeros programas, se constituyó la Red de Programas de Cribado de Cáncer (inicialmente de CM), que ha permitido, además de compartir información y experiencias en este campo, la coordinación entre todas las Comunidades Autónomas a fin de consensuar las bases para su puesta en marcha, desarrollo y evaluación conjunta (Ascunce N et al., 2013).

2. Cáncer de mama y subtipos moleculares.

El CM se considera una enfermedad heterogénea, debido al amplio espectro de características clínicas, patológicas y moleculares en su forma de presentación.

Existen dos grandes grupos histológicos: el carcinoma ductal infiltrante (CDI), que representa el subtipo más frecuente de CM, seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) (entre un 10-15% de los casos). Diversos estudios, con resultados consistentes, muestran diferencias en cuanto al perfil molecular y supervivencia de estos dos grandes grupos histológicos de CM, de tal manera, que el CLI tiene un patrón de crecimiento diferente, con tendencia a mayor tamaño, con frecuencia receptores de estrógenos negativos (RE-) y receptores de progesterona positivos (RP+) y menos agresivos que su homólogo el CDI. Sin embargo, clásicamente, estos dos tipos de CM se han tratado de forma similar en cuanto a la terapia sistémica adyuvante, de acuerdo al tamaño tumoral, grado histológico, estatus hormonal y estatus Her2 (Jemal A et al., 2011).

Más recientemente, estudios de perfiles de expresión génica han identificado diferentes subtipos moleculares de CM, que se correlacionan con salidas diferentes en cuanto a respuesta de tratamiento sistémico y pronóstico. Esta clasificación molecular propone 4 tipos de CM (Perou CM et al., 2000; Sorlie T et al., 2001):

- Luminal A: tumores que se caracterizan por expresión de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) (> 20%), Her2 negativo, Ki67 bajo (< 14%), score bajo de riesgo de recurrencia en test genéticos.
- Luminal B (her2 negativo): tumores que se caracterizan por expresión de RE y Her2 negativo y al menos uno de :
 - Ki 67 alto.
 - RP negativo o bajo.
 - Riesgo de recurrencia alto en test genéticos.

- Luminal B (her2 positivo): tumores que se caracterizan por expresión de RE, Her2 sobreexpresado o amplificado, cualquier valor de Ki67 y cualquier nivel de expresión de RP.
- Cerb2: Her2 sobreexpresado y amplificado. Receptores hormonales (RH) negativos.
- Basal like: Triple negativo, RH negativos, Her2 negativo.

Hoy se sabe que el subtipo molecular está relacionado con el pronóstico de la enfermedad y supervivencia, de tal manera que aquellos tumores con un fenotipo molecular Luminial A son los que se relacionan con una mayor supervivencia.

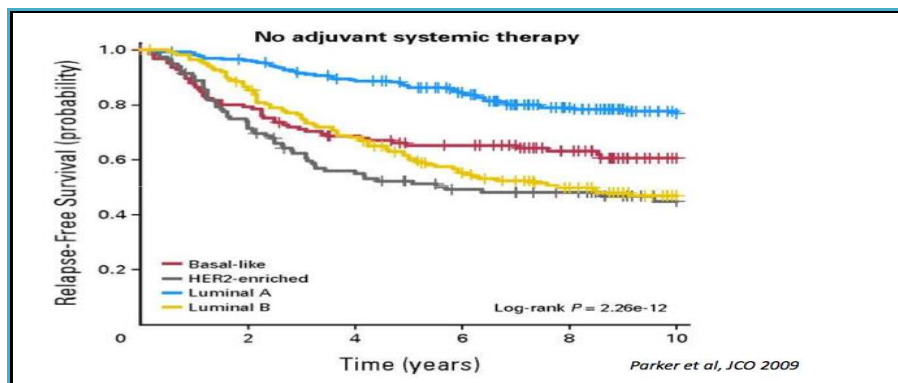


FIGURA 2: Supervivencia libre de enfermedad (SLE) según subtipo molecular en pacientes sin afectación ganglionar y quimioterapia adyuvante (Parker J et al., 2009).

Actualmente, esta clasificación molecular del CM forma parte de la práctica clínica habitual, y es decisiva en la evaluación pronóstica de la enfermedad, así como en la elección del tratamiento sistémico. De acuerdo con las guías clínicas de St. Gallen 2013, la decisión sobre el tratamiento sistémico adyuvante debería de basarse en el fenotipo intrínseco determinado por RE/RP, Her2 y ki67, con la ayuda de test genéticos, siempre que sea posible (Mamma Print, Oncotype DX), sobre todo para tumores luminales, donde no esté claro el uso de la quimioterapia (Senkus E et al., 2013).

3. Inmunología tumoral.

3.1. Introducción.

El sistema inmunológico es una extraordinaria maquinaria implicada en el mantenimiento de la integridad del organismo y en la regulación de su propia función, para adaptar sus estrategias de reconocimiento molecular en un contexto dinámico. Estas

Implicación de perfiles immuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

estrategias son moduladas por la naturaleza del estímulo antigénico, el estado interno de sus componentes y el microambiente local, que determinarán una respuesta de tolerancia o inmunidad efectora. La generación de una respuesta inmunológica eficiente frente a antígenos extraños, debe acompañarse necesariamente de una regulación rigurosa de la activación inmunológica para prevenir daños colaterales.

Se sabe, que una de las funciones más importantes del sistema inmunológico es conferir protección frente a patógenos externos como virus, bacterias y parásitos. Sin embargo, ha sido un tema muy debatido si la prevención del cáncer es una función primaria del sistema inmune.

El cáncer es una enfermedad que se inicia debido a una acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que ocurren en una célula normal, alterando su crecimiento y supervivencia. Además se considera una enfermedad de “microambiente e inmunidad”. Es decir, multitud de señales son emitidas dentro del microambiente tumoral tanto por células estromales y endoteliales como por células neoplásicas, interaccionando entre ellas. Y células del sistema inmune son decisivas en determinar la progresión versus la latencia, o bien la eliminación de la lesión neoplásica iniciada.

3.2. Teoría de la Inmunovigilancia.

Paul Ehrlich (Ehrlich P, 1909) fue uno de los primeros en introducir el concepto de inmunovigilancia al plantear la idea de que el sistema inmune podría ejercer un efecto represor sobre la formación de tumores. De manera llamativa, al mismo tiempo (1891) Willian B Coley hizo la sorprendente observación de que en algunos pacientes con cáncer que desarrollaban infecciones bacterianas, también experimentaban una regresión de su tumor. Posteriormente, Coley realizó un experimento usando cultivos bacterianos inactivados por el calor que inoculaba en pacientes con cáncer y enfermedad avanzada, experimentando algunos pacientes una marcada reducción tumoral, prolongando la supervivencia después del tratamiento. Las toxinas de Coley (Coley WB, 1991), como las conocemos actualmente, son productos bacterianos con un fuerte potencial inmunogénico.

Finalmente, el concepto de vigilancia inmune contra el cáncer, no fue ampliamente estudiado hasta después de los años 40 (1950s) con los trabajos de Medawar y colaboradores, los cuales mostraron la existencia de antígenos tumorales en sus estudios de trasplantes de tejidos (Medawar P, 1944). Los primeros experimentos con cepas no emparentadas de ratón apuntaban a que el sistema inmune era capaz de reconocer y destruir tumores trasplantados entre ellas, pero al introducir cepas singénicas se observó, que el mecanismo desarrollado era de rechazo a un tejido no emparentado, en vez de rechazar el tejido tumoral. Sin embargo, posteriormente, se demostró que los ratones podrían estar inmunizados contra trasplantes singénicos de tumores inducidos por carcinógenos químicos, virus o por otras causas, estableciéndose la existencia de antígenos tumorales específicos, lo que supuso un empuje decisivo para la hipótesis de la inmunovigilancia, ya que claramente no podría haber

inmunovigilancia tumoral si no hubiera estructuras distintivas en las células tumorales que pudieran ser reconocidas por el sistema inmunológico (Klein G, 1966; Old LJ and Boyse EA, 1964). Las células del sistema inmune serían así capaces de detectar la presencia y reconocer estructuras específicas de la superficie celular tumoral, o bien responder ante moléculas solubles secretadas por el propio tumor. En base a este mayor conocimiento de la inmunología tumoral, Burnet y Thomas sugirieron que los linfocitos eran los responsables de reconocer y eliminar las células transformadas, y que por lo tanto, la principal función de la inmunidad celular era proteger al organismo de enfermedades neoplásicas, quedando así formalmente postulada la “teoría de la inmunovigilancia tumoral” (Burnet FM, 1964, 1970, 1971; Thomas L, 1959, 1982).

Tras la aparición de la teoría de la inmunovigilancia se desarrollaron diferentes experimentos encaminados a probar si individuos inmunocomprometidos mostrarían un incremento en la incidencia de tumores espontáneos o inducidos químicamente. Algunos grupos trabajaron con ratones a los que sometían a una timectomía neonatal como mecanismo para inducir inmunosupresión, pero los resultados no eran consistentes (Burstein NA y Law LW, 1971; Grant GA y Miller JF, 1965; Nomoto K y Takeya K, 1969; Sanford BH et al., 1973). Por una parte, estos ratones inmunodeprimidos experimentaban una mayor susceptibilidad a tumores inducidos por virus y linfomas espontáneos comparados con ratones inmunocompetentes. Pero, por otro lado, esa mayor prevalencia de neoplasias que se veía, podría ser explicada por el resultado de una mayor susceptibilidad del huésped inmunocomprometido a infecciones por virus oncogénicos y la estimulación antigénica mantenida por un estado de infección crónica daría lugar a un incremento en la proliferación de linfocitos, mutaciones somáticas y por último la formación de linfomas.

La identificación y caracterización de ratones *nude* atímicos permitió estudiar la formación del tumor en un huésped con un daño inmunológico genético (Flanagan SP, 1996; Pantelouris EM, 1968). El trabajo de Osias Stutman (Stutman O, 1974, 1975, 1979) representó uno de los más importantes y extensos estudios en este tipo de ratones y permitió analizar si la inmunovigilancia tenía lugar en un entorno fisiológico. Stutman encontró que la cepa de ratones *nude* CBA/H no desarrollaba más tumores inducidos químicamente, ni presentaba un menor tiempo de latencia tras la inyección del carcinógeno metilcolantreno (MCA) en comparación con las cepas salvajes, confirmándose este hecho también por otros investigadores (Rygaard J y Povlsen CO, 1974a, 1974b).

Dado que los resultados obtenidos utilizando ratones *nude* fueron más concluyentes que los que aportaron los trabajos realizados con ratones inmunodeprimidos experimentalmente, unido al limitado conocimiento de los defectos inmunológicos de los ratones *nude* en ese tiempo, estos resultados fueron muy convincentes, lo que hizo que se abandonara la hipótesis de la inmunovigilancia.

Retrospectivamente se sabe, en referencia a esos experimentos, que existen algunos puntos controvertidos, como por ejemplo, el conocimiento actual de que los ratones *nude* no están totalmente inmunocomprometidos. Aunque dichos ratones poseen menos células T que los ratones salvajes, presentan poblaciones de linfocitos portadores de receptores para células T $\alpha\beta$ funcionales (Melekar JR y Sherman LA, 1987; Hunig T, 1983). Por tanto, no es posible predecir el efecto de estas células T sobre la formación del tumor cuando se comparan con los controles salvajes.

Entre mediados de la década de los 70 y 90, se hicieron varios experimentos en un intento de retomar el concepto de la inmunovigilancia. El descubrimiento de las células *Natural Killer* (NK) llevó a considerar la posibilidad de que este tipo de células funcionaban como efectoras de la inmunovigilancia, aunque no se llegó a tener un entendimiento preciso de las mismas (Herberman RB y Holden HT, 1978).

Entre 1994 y 1998, dos hallazgos claves renovaron el interés en el proceso de la inmunovigilancia en cáncer. El primero de ellos, el conocimiento de que la producción endógena de interferón gamma (INF γ) protegía al huésped contra el crecimiento de tumores trasplantados y la formación de tumores espontáneos o químicamente inducidos (Dighe AS et al., 1994; Kaplan DH et al., 1998). La segunda de las claves provino de la observación de que la cepa de ratones C57BL/6 que perdían porfirina (componente de los gránulos citolíticos de linfocitos T citotóxicos y células NK que actúa como importante mediador en la eliminación de células tumorales linfocito-dependiente) era más propensa a desarrollar tumores inducidos por el carcinógeno metilcolantreno (MCA) y presentaba una mayor incidencia de linfomas espontáneos diseminados que los ratones salvajes (Street SE et al., 2001; Van der Broek MF et al., 1996; Smyth MJ et al., 2000; Russel JH y Ley TJ, 2002; Street SE et al., 2002). Estas observaciones mostraron que los componentes del sistema inmune estaban implicados en el control del desarrollo de tumores primarios.

Sin embargo, a pesar de la fuerte evidencia de la existencia por parte del sistema inmune, de una función de inmunovigilancia frente a tumores, es conocido que individuos inmunocompetentes desarrollan neoplasias, siendo algunas de ellas refractarias a los tratamientos. Esta realidad clínica puede ser explicada por un fallo inicial, en la respuesta innata y adaptativa, por parte del huésped, para erradicar las células transformadas. Ese fallo, junto con la estimulación mantenida del sistema inmune favorece el crecimiento de tumores con una reducida inmunogenicidad. El término de *cáncer immunoediting* enfatiza el papel dual que ejerce el sistema inmune tanto en la eliminación como en la formación de la neoplasia durante los periodos de *equilibrio* y *escape* (Dunn GP et al., 2002, 2004a, 2004b; Shankaran V et al., 2001).

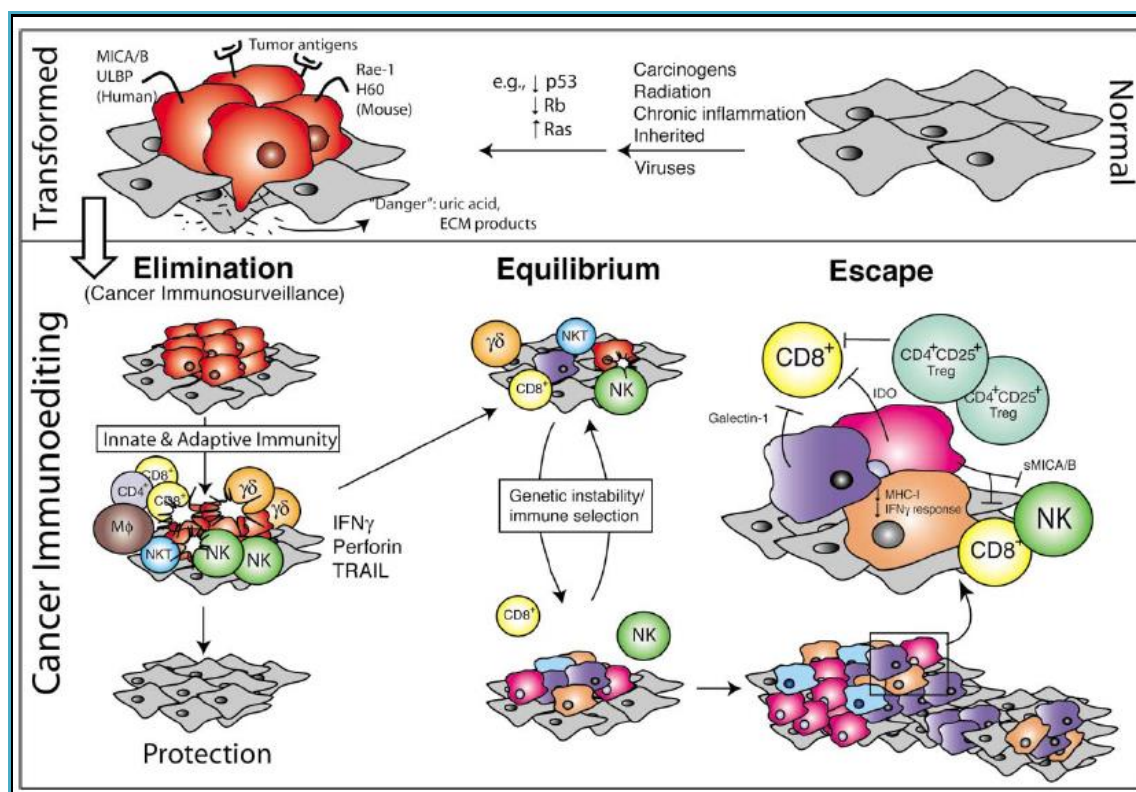


FIGURA 3: Las tres fases del proceso de *Cancer Immunoediting* (Dunn GP et al., 2004a).

Cancer immunoediting es un proceso dinámico compuesto de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. La fase de *eliminación* representa el concepto clásico de la inmunovigilancia frente al cáncer. *Equilibrio* es el periodo de latencia mediado por el sistema inmune después de una destrucción incompleta del tumor en la fase de eliminación. Y por último, la fase de *escape* se refiere al crecimiento final del tumor que ha escapado al control inmunológico en la fase de equilibrio.

3.3. Eliminación tumoral.

La fase de *eliminación* comprende el concepto original de inmunovigilancia del cáncer. Representa la forma más completa del proceso conocido como *immunoediting* sin llegar a progresar a sus otras dos fases. Representa una forma de “supresión extrínseca” del tumor por parte del sistema inmune, solo después de que las células transformadas hayan burlado sus propios mecanismos “intrínsecos” de control (Macleod K, 2000). No obstante, desencadenantes, como por ejemplo una infección por un virus potencialmente oncogénico, pueden estimular la inmunidad, al mismo tiempo, junto con la activación de los mecanismos de supresión tumoral “intrínsecos”. El rechazo inmunológico sobre el desarrollo de un tumor, así como la defensa del huésped de patógenos infecciosos, requiere una respuesta integrada que envuelve a ambos brazos del sistema inmune (las respuestas innata y adaptativa). (Figura 4a).

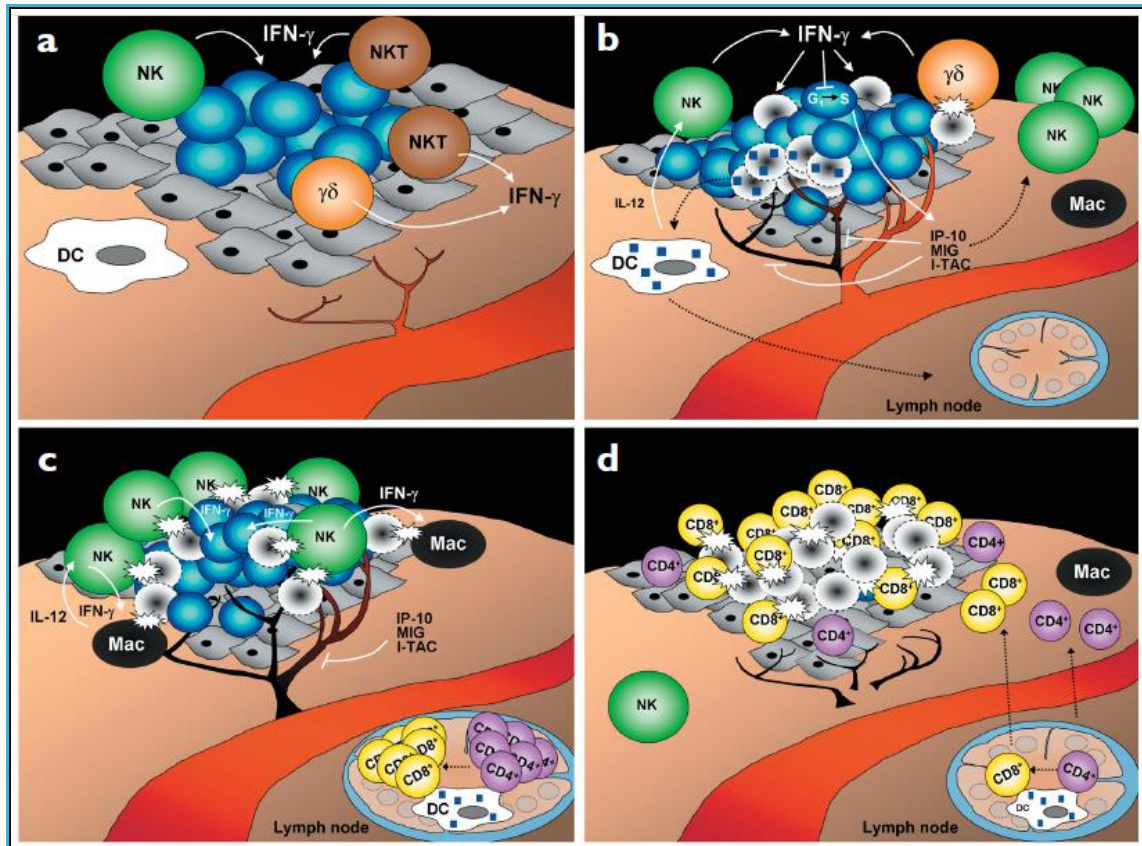


FIGURA 4: *Cancer Immunoediting* (Dunn GP et al., 2002).

Se propone, que el inicio de la respuesta anti-tumoral ocurre, cuando células del sistema inmune innato llegan a alertarse de la presencia del crecimiento de un tumor, debido al daño que se produce sobre el tejido local, como resultado de mecanismos como la angiogénesis e invasión tisular (Carmeliet P y Jain RK, 2000; Hanahan D y Folkman J, 1996; Hanahan D y Weinberg RA, 2000; Sternlich MD y Werb Z, 2001). La remodelación que tiene lugar en el estroma tisular durante este proceso, daría lugar a moléculas pro-inflamatorias, que junto con quimocinas producidas por las propias células tumorales (Vicari AP y Caux C, 2002), atraerían a células de la respuesta inmune innata hacia ese punto de daño local (Matzinger P, 1994).

Consistente con este “modelo de daño tisular”, es posible que las células dendríticas (CDs) actúen como centinelas que monitorizan el estrés tisular, el daño, o la transformación celular. Y que esas “señales de daño” puedan tomar la forma de proteínas de “choque caliente”(heat-shock- HSPs), (liberadas como resultado del daño producido por células tumorales o necrosis), productos de degradación de la matriz extracelular o factores pro-inflamatorios (incluyendo citoquinas liberadas por degradación de células tumorales y células reactivas de la respuesta innata del huésped). Algunas de esas citoquinas (por ejemplo interleuquina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (FNT α), interferón tipo I (INF-tipo I), factor estimulante de macrófagos (GM-CSF) e interleuquina 15 (IL-15)), pueden promover la

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

diferenciación de las células dendríticas y activarlas por diferentes mecanismos, favoreciendo por tanto la interacción entre células dendríticas, células NK y células T.

Las células NK, los macrófagos, las células $T\gamma\delta+$ y/o las células T NK pueden ser reclutadas rápidamente al lugar de daño tisular y reconocer moléculas inducidas por las propias células tumorales, en su proceso de transformación, o bien por la incipiente respuesta inflamatoria, así como ligandos de estrés a través de los receptores NKG2D. (Figura 4b). Además, las células T y células T NK son capaces de detectar el desarrollo incipiente tumoral, vía interacción receptor de célula T (TCR) con compuestos peptídicos asociados al tumor presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o bien compuestos glico-lipídicos expresados en células tumorales, presentados por CD1 (molécula presentadora de antígenos no clásica), respectivamente (Smyth MJ et al., 2002). Estas células del sistema inmune del huésped, podrían entonces emplear mecanismos citotóxicos efectores encaminados a eliminar las células transformadas y secretar interferón que controlaría el crecimiento tumoral y amplificaría la respuesta inmune por diferentes mecanismos. Se sabe que el interferón γ (IFN- γ) que es liberado inicialmente en el sitio del tumor, es capaz de inducir la producción local de citoquinas que reclutarían más células del sistema inmune innato hacia el tumor. Adicionalmente se llevan a cabo un número de procesos que son dependientes del IFN- γ , incluyendo entre ellos efectos anti-proliferativos (Bromberg JF et al., 1996), pro-apoptóticos (Kumar A et al., 1997), y angiostáticos, dando lugar por otro lado, a la muerte de células tumorales (Coughlin C et al., 1998; Luster AD y Leder P, 1993; Qin Z y Blankenstein T, 2000). De manera similar, los productos resultantes de la degradación de la matriz celular donde asienta el tumor, pueden producir un circuito de feedback entre la infiltración del tumor por macrófagos (IL-12) y células NK (IFN- γ) (Hodge-Dufour J et al., 1997; Bancroft GJ et al., 1991).

En la siguiente fase, antígenos tumorales que son liberados por una gran variedad de células muertas junto con el entorno de señales propiciado por la respuesta inmune innata favorecen el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa específica tumoral (Figura 4c). Las CD inmaduras que fueron reclutadas inicialmente al lugar del tumor, sufren una activación, o bien por exposición a citoquinas liberadas durante la respuesta inmune innata, o bien por interacción con células NK existentes en el infiltrado tumoral (Gerosa F et al., 2002). Estas CD activadas son capaces de reconocer antígenos tumorales, bien directamente por ingestión de restos de células tumorales que han sufrido apoptosis, o bien vía indirecta mediante transferencia de compuestos de células tumorales como resultado de unión de proteínas de choque con antígenos tumorales (Li Z et al., 2002; Srivastana P, 2002). Una vez activadas, pueden adquirir un fenotipo maduro y en respuesta a quimocinas y/o citoquinas, migrar a los ganglios linfáticos donde inducen la activación de células T CD4+ Th1 específicos para el tumor. Las células Th1 facilitan el desarrollo de linfocitos T CD8+ específicos del tumor, a través de la vía de presentación antigénica de péptidos tumorales por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I en células dendríticas (Huang AY et al., 1994). En algunos casos, los péptidos derivados de antígenos tumorales, son presentados directamente a células

CD4+ o CD8+ por medio de moléculas del MHC clase II y clase I, respectivamente. Y la activación de células B, también puede ocurrir en este contexto.

En la última fase, el desarrollo de la inmunidad adaptativa específica, proporciona al huésped de una capacidad para eliminar completamente el desarrollo del tumor (Figura 4d). Las células T CD4+ producen IL-2 que junto con la producción endógena del huésped de IL-15, ayuda a mantener la función y viabilidad de las células T CD8+ específicas del tumor. Estos linfocitos, a su vez son capaces de reconocer a sus dianas tumorales, induciendo muerte celular por mecanismos directos e indirectos. En experimentos *in vivo*, se sabe que las células T CD8+ pueden eliminar directamente a células tumorales. Además producen gran cantidad de INF- γ , el cual interacciona con las células tumorales, produciendo muerte celular, por diversos mecanismos, como inhibición de su ciclo celular, apoptosis, angiostasis e activación de macrófagos. Estos dos escenarios no son mutuamente excluyentes y en la mayoría de las ocasiones se desarrollan de manera concomitante. Sin embargo, la contribución relativa de cada uno de ellos, puede variar según el tipo de tumor.

Por tanto, la *fase de eliminación* es un proceso dinámico y activo que debe repetirse cada vez que surjan células neoplásicas antigénicamente diferentes. Por esta razón, es un hecho a tener en cuenta, que el cáncer es una enfermedad más prevalente en población añosa, donde las funciones del sistema inmune y por lo tanto su papel de *inmunovigilancia* frente al cáncer tiende a declinar.

3.4. Escultura inmunológica e immunoediting.

Incluso cuando la fase de eliminación del proceso de *immunoediting* falla, la relación que se establece entre el sistema inmune y el cáncer, no ha hecho más que empezar. Un ejemplo de la complejidad de esta relación está basado en trabajos que comparan la inmunogenicidad de tumores derivados de ratones inmunocomprometidos con inmunocompetentes. Los sarcomas que se inducían con el carcinógeno metilcolantreno (MCA) en un ambiente inmunodeficiente, resultaban ser tumores más inmunogénicos que aquellos que se desarrollaban en huéspedes inmunocompetentes (Engel AM et al., 1996; Shankaran V et al., 2001; Svane IM et al., 1996). Esos resultados muestran, que los tumores son modificados, de alguna forma, por el ambiente inmunológico en el que se desarrollan. A este proceso se le ha llamado *imprinting*. Este proceso de *imprinting* a menudo tiene como resultado la generación de tumores que están mejor capacitados para evitar los mecanismos de supresión tumoral del sistema inmunológico, mediante la eliminación de células tumorales con una alta inmunogenicidad intrínseca y la conservación de variantes tumorales que o bien tienen una inmunogenicidad reducida o bien han adquirido otros mecanismos para evadir el sistema inmune, lo que las capacitaría mejor para sobrevivir en un huésped inmunocompetente. Por lo tanto, un tumor que ha vencido a la fase de *eliminación* del proceso de *immunoediting* puede experimentar las dos siguientes fases en su interacción con el sistema inmune del huésped: *equilibrio*, seguida de *escape* (Dunn GP et al., 2002).

- *Equilibrio:*

Aunque la fase de *eliminación* del proceso de *immunoediting* del cáncer, puede erradicar un porcentaje significativo de células transformadas, otras pueden entrar en un periodo de latencia, extendiéndose desde el final de la fase de *eliminación* hasta el comienzo de la fase de *escape*, con la aparición de un tumor clínicamente detectable. Este periodo, constituye la fase de *equilibrio*, siendo probablemente la más larga de las tres, extendiéndose incluso hasta en años en tumores humanos. De hecho, se ha estimado que para tumores sólidos, puede existir un intervalo de hasta 20 años desde la exposición inicial al carcinógeno hasta la detección clínica del tumor (Loeb LA et al., 2003). Los eventos que tienen lugar en esta fase de *equilibrio* son similares a los que se sabían que ocurrían en el proceso denominado “estado de latencia tumoral” (Uhr JW et al., 1997; Wheelock EF et al., 1981). A pesar de que muchas células tumorales originales son destruidas, nuevas variantes surgen portando más mutaciones, proporcionándoles incremento de la resistencia al ataque del sistema inmune. Básicamente, la interacción dinámica entre inmunidad y cáncer en la fase de *equilibrio*, da lugar a una nueva población de células tumorales más adaptada para sobrevivir en el huésped inmunocompetente. Durante este periodo, la heterogeneidad y la inestabilidad genética de las células cancerígenas que sobreviven en la fase de *eliminación* son posiblemente las fuerzas principales que posibilitan a las células tumorales resistir finalmente a la inmunidad del huésped. Se ha propuesto que este *fenotipo mutador* de las células tumorales pueda resultar de tres tipos de inestabilidad genética observada en el cáncer (Loeb LA, 1991): inestabilidad de nucleótidos (NIN), inestabilidad de microsatélites (MIN) e inestabilidad cromosómica (CIN). (Lengauer C et al., 1998). De las tres, la CIN es la que se cree que es el mecanismo predominantemente responsable de desestabilizar la integridad genómica. De hecho, este mecanismo coincide, con la observación de que el genoma de células cancerígenas, presenta ganancias o pérdidas de cromosomas enteros (por ejemplo aneuploidías), asociado con una pérdida del 25-50% de sus alelos.

No obstante, la fase de *equilibrio*, dentro del proceso de *immunoediting* del cáncer es la menos conocida. Actualmente son necesarios nuevos trabajos que permitan tanto probar su existencia como conocer los mecanismos que se requieren para desarrollar nuevos fenotipos tumorales e identificar cuáles son los “editores” de la “escultura inmunológica” del tumor.

Finalmente, una célula tumoral que entra en el periodo de latencia, dentro de la fase de *equilibrio*, tiene tres posibles salidas: eliminación por parte del sistema inmune, mantenerse de forma permanente en esa fase de *equilibrio* gracias al control del sistema inmune, o bien evadir la presión inmune y pasar finalmente a la fase de *escape*, dentro del proceso de *immunoediting*.

- *Escape:*

En esta fase de *escape*, algunas de las variantes celulares que han sobrevivido a la fase de *equilibrio*, desarrollan la capacidad para crecer en un ambiente inmunológicamente intacto. Esta brecha en las defensas del sistema inmune del huésped ocurre, cuando cambios genéticos y epigenéticos en las células tumorales les confiere resistencia para la detección por parte del sistema inmune, o bien por mecanismos intrínsecos del tumor, creando un estado de supresión inmunológica o tolerancia en el huésped, permitiendo así el crecimiento y expansión del mismo hasta llegar a hacerse clínicamente detectable. Dado que ambos brazos del sistema inmune (es decir, respuesta innata y adaptativa), actúan en el mecanismo de inmunovigilancia contra el cáncer, los tumores tienen por tanto que eludir, a uno o ambos brazos, para conseguir su crecimiento progresivo. Las células tumorales son capaces de emplear múltiples estrategias inmuno-evasivas para eludir al sistema inmune. Actualmente se sabe que existen determinados eventos inmunológicos que van “esculpiendo” al tumor. El grado de inmunogenicidad de cada tumor, se forma por su interacción con el sistema inmune del huésped y éste puede ser determinado por la identidad de los editores del sistema inmune que operan durante la fase de *equilibrio*. Es posible, que el *escape* tumoral en cada tejido de origen, se deba a mecanismos diferentes. Estos mecanismos de *escape* tumoral se agrupan en dos categorías básicas: mecanismos intrínsecos al tumor, relacionados con las células tumorales y sus antígenos, y mecanismos extrínsecos al tumor, relacionados con el sistema inmune del huésped. El primer grupo incluye:

- a) Bajo nivel de expresión de Ag tumorales en fases tempranas del desarrollo tumoral (Spiotto MT et al., 2004).
- b) Pérdida de epítopes antigénicos.
- c) Existencia de una barrera física que impide que las células efectoras del sistema inmune accedan al tumor.
- d) Pérdida de respuesta a los interferones (IFNs) (Dunn GP et al., 2005; Kaplan DH et al., 1998; Wong LH et al., 1997).

Y el segundo grupo:

- a) Ignorancia.
- b) Tolerancia de las células T a Ag específicos del tumor.
- c) Supresión de células T causada por factores liberados por el propio tumor (por ejemplo TGF β , IL-10, VEGF, etc), (Gabrilovich DI et al., 1996; Gorelik L y Flavell RA, 2001; Gorelik L y Flavell RA, 2002).
- d) Liberación de ligandos solubles que bloquean la activación de linfocitos (por ejemplo NKG2D-L) (Groh V et al., 2002).
- e) Defectos en la presentación antigénica por parte de células presentadoras de antígenos profesionales.
- f) Daño en la maduración de las células presentadoras de antígenos (Wang T et al., 2004).

3.5. Inmunovigilancia/*immunoediting* en humanos:

Ante las evidencias que demuestran la existencia de inmunovigilancia en ratones, cabe preguntarse si en humanos sucederá lo mismo. La predicción lógica de la teoría de la inmunovigilancia es que los humanos inmunodeficientes o inmunodeprimidos deberían mostrar una mayor incidencia de cáncer. Estudios realizados en pacientes inmunodeficientes han demostrado, en líneas generales, una elevada incidencia de tumores inducidos por virus, así como linfomas no Hodgkins, sarcomas de Kaposi y carcinomas del área anal y tracto urogenital comparado con individuos inmunocompetentes (Boshoff C y Weiss R, 2002; Pen I y Starzl TE, 1970). En contraste, se sabe que los cánceres de origen no viral, pueden tardar muchos años en desarrollarse, y dado que los individuos inmunodeficientes a lo largo de su vida van a ser susceptibles de infecciones virales y bacterianas, la aparición de tumores en estos individuos, siempre va a generar dudas sobre su origen. Aun así, actualmente existen hasta tres evidencias de peso que apoya la existencia de la inmunovigilancia en humanos:

- a) Donantes de trasplantes (que se encuentran inmunodeprimidos), presentan mayor incidencia de cánceres no virales que controles inmunocompetentes de la misma edad.
- b) Pacientes con cáncer, desarrolla una respuesta inmune (innata y adaptativa) específica para el tumor que tienen.
- c) Presencia de infiltración linfocitaria del tumor, puede ser un indicador pronóstico de la supervivencia del paciente.

Hasta la fecha se han revisado una gran variedad de estudios realizados en pacientes trasplantados e inmunodeprimidos (Dunn GP et al., 2002; Dunn GP et al., 2004b). La evaluación de miles de pacientes trasplantados en el mundo occidental, ha revelado un incremento del riesgo relativo para un amplio subtipo de tumores sin aparente origen viral (por ejemplo colon, pulmón, vejiga, páncreas, riñón, urotelio, melanoma, carcinomas escamosos y tumores endocrinos). Esta observación indica que el tratamiento inmunosupresivo predispone por tanto a los pacientes trasplantados, o bien a la formación de tumores de *novo*, o bien a la reactivación del crecimiento de tumores que han permanecido silentes, controlados por el sistema inmune en la fase de *equilibrio*. De hecho, un escenario clínico, que demuestra claramente la existencia de esta fase de *equilibrio* en humanos, es precisamente este hecho: la transmisión de tumores, del órgano trasplantado del donante al receptor. Un estudio publicado recientemente, muestra la aparición de metástasis de melanoma 1-2 años después del trasplante en dos receptores alogénicos que habían recibido cada uno un riñón del mismo donante (Mackie RM et al., 2003). Posteriormente se supo que el donante había sido tratado de un melanoma primario 16 años antes de su muerte y se había considerado libre de enfermedad en el momento de la donación de sus órganos. Este estudio junto a otros en la literatura (Elder GJ et al., 1997, Penn I, 1996; Suranyi MG et al., 1998) sugieren que la supresión farmacológica del sistema inmune de esos pacientes trasplantados facilitó la rápida y progresiva reactivación de tumores ocultos, que fueron mantenidos silentes en una fase de

equilibrio por el sistema inmune intacto del donante. De forma global, esos resultados apoyan la existencia de una acción protectora de la inmunidad frente a tumores en humanos.

Otra evidencia de la inmunovigilancia en humanos se basa en la existencia de una respuesta inmune natural y específica, observada en pacientes con neoplasias y síndromes neurológicos paraneoplásicos autoinmunes (PNDs), debida a una reacción frente a Ag presentes tanto en el tejido neuronal sano como tumoral (Albert ML y Darnell RB, 2004; Darnell RB y Posner JB, 2003). Clínicamente los PNDs pueden afectar a cualquier parte del sistema nervioso y son más frecuentes asociados a tumores de mama, pulmón y ovario. En los años 80's se estableció una relación inmunológica entre la degeneración neuronal y la presencia de cáncer, al descubrir que el suero y el líquido cefalorraquídeo (LCR) de estos pacientes contenían títulos elevados de anticuerpos (Ac) que reaccionaban ante la presencia de Ag presentes tanto en la población de células neuronales, como en células neoplásicas (Darnell RB, 1996; Musunuru K y Darnell RB, 2001). Igualmente, también se identificó en sangre periférica y en LCR de pacientes con PNDs la presencia de linfocitos T citotóxicos (LTc). Datos de otros estudios probaron una correlación positiva entre la presencia de Ac con la extensión de la enfermedad neoplásica, la respuesta al tratamiento y la supervivencia (Darnell RB y DeAngelis LM, 1993; Graus F et al., 1997).

Claramente, este tipo de estudios supuso un empuje tecnológico para permitir el conocimiento de los efectos del sistema inmune en el desarrollo y establecimiento de los tumores humanos.

Por último, otra prueba evidente de que el proceso de inmunovigilancia del cáncer existe en humanos, es la fuerte correlación observada entre la presencia de linfocitos infiltrados en el tumor (TILs) y la supervivencia del paciente.

TABLA 1: TIL y pronóstico del cáncer en humanos (Smyth MJ et al., 2006).

Cell type	Disease	Prognosis
CD8 ⁺ T	Melanoma	Brisk TIL = better (Clemente <i>et al.</i> , 1996) (Mihm <i>et al.</i> , 1996)
CD8 ⁺ T	Ovarian Ca.	TIL = better (Zhang <i>et al.</i> , 2003)
CD8 ⁺ T	Duke's Colorectal Ca.	TIL = better (Naito <i>et al.</i> , 1998)
CD8 ⁺ T	Esophageal Ca.	TIL = better (Schumacher <i>et al.</i> , 2001)
T cell	Follicular lymphoma	Signature TIL = better (Dave <i>et al.</i> , 2004)
NK cell	Gastric Ca.	TIL = better (Ishigami <i>et al.</i> , 2000)
NK cell	Squamous cell Ca.	TIL = better (Villegas <i>et al.</i> , 2002)
NK cell	Colorectal Ca.	TIL = better (Coca <i>et al.</i> , 1997)
Treg	Ovarian Ca.	Poor (Curiel <i>et al.</i> , 2004)
NKT	Multiple myeloma	Functional NKT = better (Dhodapkar <i>et al.</i> , 2003)

Estos resultados se han validado en un gran número de pacientes con melanoma primario (Clemente CG et al., 1996; Mihm MC Jr et al., 1996), carcinoma de ovario (Zhang L et al., 2003), carcinoma colorrectal (Naito Y et al., 1998) y carcinoma de esófago (Schumacher K et al., 2001). Otros estudios también mostraron similar correlación positiva entre la infiltración tumoral por células NK y la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico (Ishigami S et al., 2000), carcinoma escamoso de pulmón (Villegas FR et al., 2002) y carcinoma colorrectal (Coca S et al., 1997).

4. Moléculas implicadas en la respuesta inmune: Complejo Mayor de Histocompatibilidad y receptores NKG2D y CTLA-4.

4.1. Un poco de historia...

El sistema genético más importante en la regulación de las reacciones inmunes es el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, acrónimo para el inglés Major Histocompatibility Complex). Se trata de un sistema de genes ligados, altamente polimórficos, que se ha conservado filogenéticamente y se ha podido demostrar en todos los vertebrados estudiados (Klein J, 1986). El principal papel del MHC es el control de la expresión de moléculas de la superficie celular que actúan como marcadores de lo propio en el desarrollo de la respuesta inmune.

El primer sistema de histocompatibilidad descrito fue el de ratón, mediante el uso de técnicas de genética clásica aplicadas al estudio del rechazo de trasplantes de tejidos tumorales y sanos (Snell GD, 1948). Más tarde, en la década de los 50's, varios autores contribuyeron con sus trabajos a la caracterización de un sistema similar en humanos (Dausset J, 1954; Van Rood JJ et al., 1958, Payne R y Rolfs MR, 1958). En estos estudios se detectaron Ac en el suero de pacientes politrasfundidos y en el de mujeres multíparas que eran capaces de aglutinar leucocitos de donantes no relacionados. Los patrones de leucoaglutinación revelaban la presencia de Ag definibles en poblaciones humanas, por lo que recibieron el nombre de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA, de Human Leukocyte Antigens). Poco después se pudo comprobar la relación existente entre estos antígenos y la supervivencia de los aloinjertos (Van Rood JJ et al., 1965, 1967). No obstante, no fue hasta los años 70's cuando se supo realmente la función biológica de estas moléculas. De nuevo, trabajos realizados por varios equipos pusieron de manifiesto que las moléculas codificadas por el MHC son las responsables de proporcionar el contexto adecuado para el reconocimiento de los Ag por parte de los linfocitos T (Zinkernagel RM y Doherty PC, 1974) ejerciendo así un papel crucial en el desarrollo y control de la respuesta inmune (Benacerraf B y McDevitt HO, 1972).

Los antígenos HLA son moléculas altamente polimórficas. En la actualidad se han definido ya centenares de este tipo de antígenos. Esto ha sido posible gracias a la estrecha colaboración establecida entre los laboratorios que trabajan en histocompatibilidad a través

de los Workshop Internacionales de Histocompatibilidad que desde 1964 se celebran periódicamente.

4.2. Genética del complejo mayor de histocompatibilidad.

Las moléculas HLA están codificadas por genes localizados dentro del MHC. Estudios citogenéticos han mapeado la región del MHC humano en la porción distal de la banda p21.3 del brazo corto del cromosoma 6, abarcando unas 4000 kilobases (kb) (4×10^6 nucleótidos) (Breuning MH et al., 1977). Es una zona genómica compleja que contiene al menos 50 genes distintos ordenados en tres regiones: clase I, clase II y clase III. Estos genes son polimórficos, presentan una localización cercana, y en general se heredan en bloque en forma de haplotipo, de acuerdo con las leyes de Medel como caracteres codominantes simples.

La **región de clase I** codifica las moléculas HLA-A, B y C y se caracteriza por un alto grado de polimorfismo en la mayoría de las especies de vertebrados. Existen otros genes de clase I humanos que presentan una secuencia homóloga con las moléculas clásicas de clase I, conocidos como genes “no clásicos”. Incluyen las moléculas HLA-E, F, G, H y un grupo de cinco genes MIC (MIC A, B, C, D y E). Estos últimos muestran un menor grado de polimorfismo y únicamente MIC A y MIC B, situados entre el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y el locus HLA-B, se expresan.

La **región de clase II** comprende unas 1000-1200 kb y se divide en seis subregiones denominadas DR, DQ, DP, DO, DN y DM. En esta región también se encuentran dos grupos de genes no-HLA. El primero de ellos está formado por los genes ABC transportadores de péptidos antigénicos, denominados genes TAP1 y TAP2 (Spies T et al., 1989) cuyos productos se asocian en forma de heterodímeros, el cual está implicado en el transporte de los péptidos antigénicos desde el citoplasma hasta el lumen del retículo endoplásmico. El segundo grupo está formado por los genes LMP2 y LMP7 (Monaco JJ y McDevitt HO, 1986) que están relacionados con el proteosoma y contienen múltiples centros catalíticos.

La **región de clase III** comprende unos 680 kb, ocupa la porción central del MHC y no tiene correlación estructural ni funcional con las regiones de Clase I y II. Incluye genes que codifican proteínas implicadas en el sistema inmune tales como los genes del complemento C4, C2 y Factor B, los genes $TNF\alpha$ y $TNF\beta$ y los genes HSP70. También aparecen en esta región genes que no tienen asociación con el sistema inmune. Por último aquí se localizan los genes BAT2 (G2) y BAT3 (G3) asociados a células B.

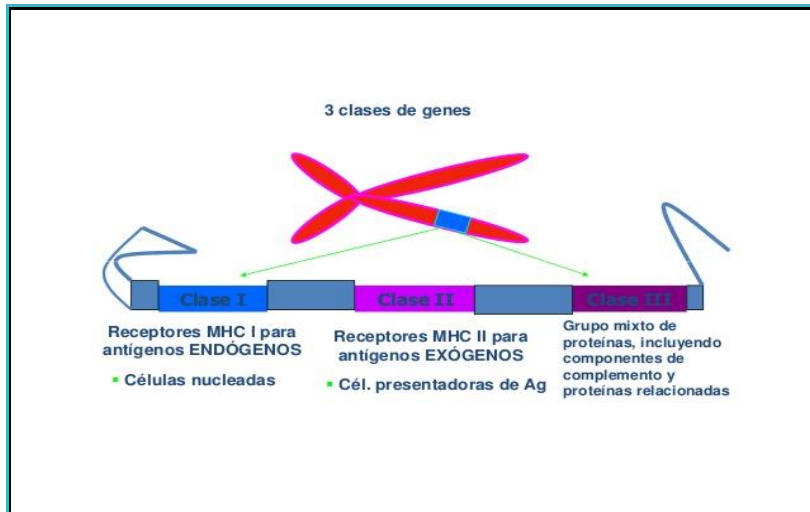


FIGURA 5: MHC en el brazo corto del cromosoma 6.

Este grupo de genes se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel como caracteres codominantes simples. La región genética de un cromosoma que contiene todos los genes HLA (salvo los que codifican la $\beta 2$ -microglobulina) se denomina haplotipo HLA.

4.3. Antígenos HLA de clase I y II.

4.3.1. Estructura.

En euterios, la **región clase I** contiene un conjunto de genes metópicos cuya presencia y orden está conservada entre especies. Estas moléculas se expresan en todas las células humanas, excepto en los glóbulos rojos, las células germinales, las células de embriones pre-implantación y el sincitiotrofoblasto (Comiskey M et al., 2000). Algunas células, como las neuronas, los monocitos y los hepatocitos, presentan niveles bajos de moléculas MHC-I (menos de 10^3 por célula) (Abbas AB y Lichtman AH, 2009).

Los genes MHC clase I (MHC-I) codifican glucoproteínas, con estructura de inmunoglobulina: presenta una cadena pesada tipo α que se subdivide en tres regiones: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Estas tres regiones están expuestas al espacio extracelular y están unidas a la membrana de la célula mediante una región transmembrana. La cadena α está siempre asociada a una molécula de microglobulina $\beta 2$ que está codificada por una región independiente en el cromosoma 15.

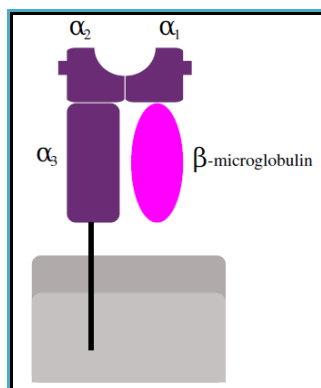


FIGURA 6: Estructura de una molécula MHC de clase I.

La principal función de los productos génicos de la Clase I es la presentación de péptidos antigénicos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos (CD8+). El péptido antigénico se aloja en una hendidura que se forma entre las regiones α_1 y α_2 de la cadena pesada, mientras el reconocimiento del MHC-I por parte del linfocito T citotóxico se hace en la cadena α_3 . En esta hendidura conformada por las regiones α_1 y α_2 , se presentan péptidos entre 8 y 11 aminoácidos, razón por la cual la presentación del péptido antigénico debe pasar por un proceso de fragmentación dentro de la propia célula que lo expresa.

Los **genes MHC clase II** (MHC-II) codifican glucoproteínas con estructura de inmunoglobulina, pero en este caso el complejo funcional está formado por dos cadenas, una α y una β (cada una de ellas con dos dominios, α_1 , α_2 , β_1 y β_2). Cada una de las cadenas está unida a la membrana por una región transmembrana, y ambas cadenas están enfrentadas, con los dominios 1 y 2 contiguos, en el exterior celular (Abbas Ab y Lichtman AH, 2009).

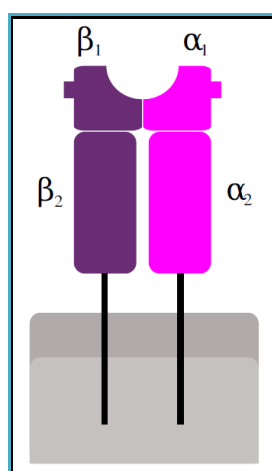


FIGURA 7: Estructura de una molécula MHC de clase II.

Estas moléculas se expresan sobre todo en las células presentadoras de antígeno (dendríticas y fagocíticas, así como los linfocitos B), donde presentan péptidos antigénicos extracelulares procesados a los linfocitos T cooperadores (CD4+). El péptido antigénico se aloja

en una hendidura formada por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, mientras el reconocimiento del MHC-II por parte del linfocito T cooperador se hace en la cadena $\beta 2$. En esta hendidura conformada por las regiones $\alpha 1$ y $\beta 1$, se presentan péptidos de entre 12 y 16 aminoácidos.

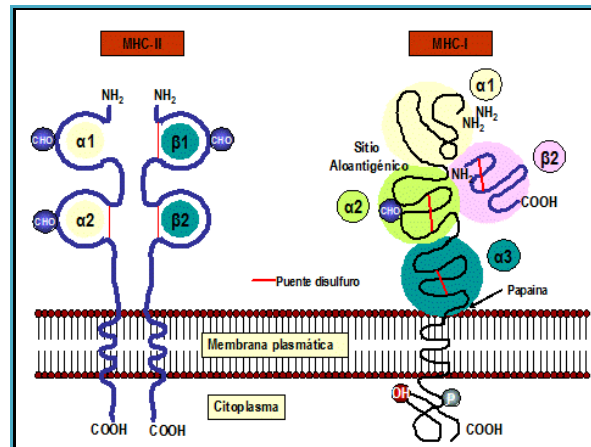


FIGURA 7: Representación estructural de las moléculas HLA clase I y II.

4.3.2. Polimorfismo del sistema HLA clase I y II.

Los genes MHC se expresan de forma codominante. Esto quiere decir que los alelos (variantes) heredados de ambos progenitores se expresan de forma equivalente.

- Como existen tres genes Clase I, denominados en humanos HLA-A, HLA-B y HLA-C, y cada persona hereda un juego de cada progenitor, cualquier célula de un individuo podrá expresar seis tipos diferentes de moléculas MHC-I.
- En el locus de Clase II, cada individuo hereda un par de genes HLA-DP (DPA1 y DPA2, que codifican las cadenas α y β), un par de genes HLA-DQ (DQA1 y DQA2, para las cadenas α y β), un gen HLA-DR α (DRA1) y uno o dos genes HLA-DR β (DRB1 y DRB3, -4 o -5). Así, un individuo heterocigoto puede heredar seis u ocho alelos de clase II, tres o cuatro de cada progenitor.

El juego de alelos presente en cada cromosoma se denomina haplotipo MHC. En humanos, cada alelo HLA recibe un número. Por ejemplo, para un individuo dado, su haplotipo puede ser HLA-A2, HLA-B5, HLA-DR3, etc. Cada individuo heterocigoto tendrá dos haplotipos MHC, uno en cada cromosoma (uno de origen paterno y otro de origen materno).

Los genes MHC son enormemente polimórficos, lo que significa que existen muchos alelos diferentes en los diferentes individuos de la población. El polimorfismo es tan grande que en una población mixta (no endogámica) no existen dos individuos que tengan exactamente el mismo juego de genes y moléculas MHC, excepto los gemelos idénticos.

Las regiones polimórficas de cada alelo se encuentran **en la zona de contacto con el péptido** que va a presentar al linfocito. Por esta razón, la zona de contacto de cada alelo de molécula MHC es muy variable, ya que los residuos polimórficos del MHC forman hendiduras específicas en las que sólo pueden introducirse cierto tipo de residuo del péptido, lo cual impone un modo de unión muy preciso entre el péptido y la molécula MHC. Esto implica que cada variante de molécula MHC podrá unir específicamente solo aquellos péptidos que encajen adecuadamente en la hendidura de la molécula MHC, que es variable para cada alelo. De esta manera, las moléculas de MHC tienen una especificidad amplia para la unión de péptidos, puesto que cada molécula de MHC puede unir muchos, pero no todos los tipos de péptidos posibles. Esta es una característica esencial de las moléculas MHC: en un individuo concreto, bastan unas pocas moléculas diferentes para poder presentar una vasta variedad de péptidos.

Por otro lado, **dentro de una población**, la existencia de múltiples alelos asegura que siempre habrá algún individuo que posea una molécula MHC capaz de cargar el péptido adecuado para reconocer un patógeno concreto. La evolución del polimorfismo de MHC asegura que una población será capaz de defenderse frente a la enorme diversidad de patógenos existentes, y que no sucumbirá ante la presencia de un nuevo patógeno o un patógeno mutado, porque al menos algunos individuos serán capaces de desarrollar una respuesta inmune adecuada para vencer al patógeno. Las variaciones en las secuencias de MHC (responsables del polimorfismo) resultan de la herencia de diferentes moléculas MHC, y no son inducidas por recombinación, como ocurre con los receptores de los antígenos.

4.3.3. Funciones de las moléculas HLA clase I y II.

Ambos tipos de moléculas presentan antígenos a los linfocitos T, responsables de la respuesta inmune específica para eliminar el patógeno que a su vez es el origen de la producción de dichos antígenos. Sin embargo, las moléculas HLA de clase I y II corresponden a dos vías diferentes de procesamiento de los antígenos y se asocian con dos sistemas diferentes de defensa inmunitaria.

Los linfocitos T de un individuo concreto presentan una propiedad denominada restricción MHC: sólo pueden detectar un antígeno si éste viene presentado por una molécula MHC del mismo individuo. Esto se debe a que cada linfocito T tiene una especificidad dual: el receptor del linfocito T (denominado TCR por T cell receptor) reconoce algunos residuos del péptido y simultáneamente algunos residuos de la molécula MHC que lo presenta. Esta propiedad es muy importante en el trasplante de órganos, e implica que, durante su desarrollo, los linfocitos T deben “aprender” a reconocer las moléculas MHC propias del individuo, mediante el proceso complejo de maduración y selección que tiene lugar en el timo.

Las moléculas MHC sólo pueden presentar **péptidos**, lo que implica que los linfocitos T, dado que sólo pueden reconocer un antígeno si viene asociado a una molécula MHC, sólo

pueden reaccionar ante antígenos de origen proteico (procedentes de patógenos) y no a otro tipo de compuestos químicos (ni lípidos, ni ácidos nucleicos, ni azúcares). En cambio, la molécula CD1 de estructura similar a las MHC-I (tres cadenas α y una β 2-microglobulina) presenta antígenos no peptídicos, generalmente lípidos a linfocitos T. Cada molécula MHC puede presentar un único péptido cada vez, dado que la hendidura de la molécula sólo tiene un espacio para alojar un péptido. Sin embargo, una molécula MHC dada tiene una especificidad amplia, porque puede presentar muchos péptidos diferentes (aunque no todos).

Las moléculas MHC adquieren péptidos que presentan en el exterior de la membrana celular durante su propia biosíntesis, en el interior celular. Por tanto, los péptidos que presentan las moléculas MHC provienen de patógenos que están en el interior celular, y ésta es la razón por la cual los linfocitos T, que sólo identifican péptidos cuando están asociados a moléculas MHC, solo detectan patógenos asociados a células y desencadenan una respuesta inmune contra patógenos intracelulares.

Es importante resaltar que las moléculas HLA-I adquieren péptidos que provienen de proteínas citosólicas, mientras que las moléculas HLA-II adquieren péptidos de proteínas contenidas en vesículas intracelulares. Por ello, las moléculas HLA-I presentarán péptidos propios, péptidos procedentes de patógenos ingeridos en fagosomas. Las moléculas HLA-II, por su parte, presentarán péptidos procedentes de patógenos ingeridos en vesículas (éste tipo de moléculas sólo se expresan en células con capacidad fagocítica). Las moléculas MHC sólo se expresan de forma estable en la membrana celular si tienen un péptido cargado: la presencia del péptido estabiliza la estructura de las moléculas MHC, las moléculas “vacías” se degradan en el interior celular. Las moléculas MHC cargadas con un péptido permanecen en la membrana durante días, el tiempo suficiente para asegurar que un linfocito T adecuado reconozca el complejo e inicie la respuesta inmunitaria.

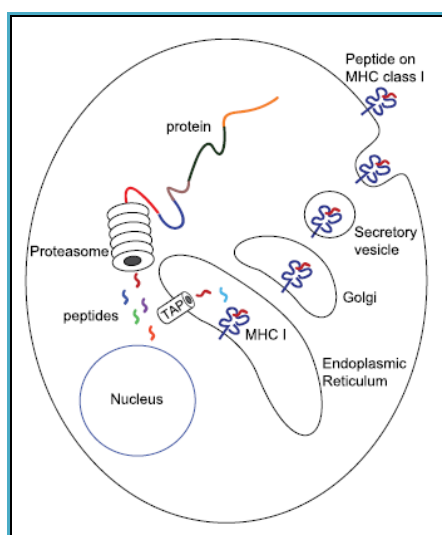


FIGURA 9: Procesamiento de péptidos asociados a moléculas MHC-I: proteínas presentes en el citosol son degradadas por el proteosoma, y los péptidos resultantes son internalizados por el canal TAP en el retículo

endoplásmico, donde se asocian con las moléculas recién sintetizadas de MHC-I. Los complejos péptido-MHC-I pasan al aparato de Golgi, donde son glucosilados, y de ahí a las vesículas secretoras, que se fusionan con la membrana celular, de forma que los complejos quedan expuestos hacia el exterior, permitiendo el contacto con los linfocitos T circulantes.

En cada individuo, las moléculas HLA pueden presentar tanto péptidos extraños (procedentes de patógenos) como péptidos procedentes de proteínas propias del individuo. Esto implica, que en un momento dado, sólo una pequeña proporción de las moléculas HLA de una célula presentarán un péptido extraño: la mayor parte de los péptidos serán propios, dando que son más abundantes. Sin embargo, los linfocitos T son capaces de detectar un péptido presentado por sólo el 0,1-1% de las moléculas HLA para iniciar una respuesta inmune.

Los péptidos propios, por otro lado, no pueden iniciar una respuesta inmune (excepto en los casos de las enfermedades autoinmunes), porque los linfocitos T específicos para los antígenos propios son destruidos o inactivados en el timo. Sin embargo, la presencia de péptidos propios asociados a las moléculas HLA es esencial para la función supervisora de los linfocitos T: estas células están constantemente patrullando el organismo, verificando la presencia de péptidos propios asociados a las moléculas HLA y desencadenando una respuesta inmune en los casos raros en los que detectan un péptido extraño.

4.3.4. Asociación HLA y enfermedad.

El conocimiento actual de la estructura y función biológica de las moléculas HLA proporciona la base para tratar de comprender los mecanismos de uno de los principales enigmas de la biología y la medicina moderna, que consiste en la asociación entre ciertos componentes del sistema HLA y la susceptibilidad o resistencia a determinadas enfermedades (Dausset J, 1981). Actualmente se conocen cientos de enfermedades, la mayoría de ellas infecciosas o autoinmunes, asociadas con uno o más genes clásicos y no clásicos de la región MHC (Brewerton DA et al., 1973; Schlösstein L et al., 1973; Contu L et al., 1998; Ma JJ et al., 1998; Noble JA et al., 2008). Una gran parte de estas asociaciones se producen con respecto a los antígenos clásicos HLA clase I y clase II, debido principalmente a su mejor caracterización y por las ventajas técnicas de identificación.

TABLA 2: ENFERMEDADES Y HLA.

Enfermedades	Alelos HLA
Artritis reumatoide	DR4
Diabetes mellitus insulino-dependiente	DR3, DQ3.2
Esclerosis múltiple	DR2
Pénfigo vulgar	DR4, DR6
Lupus eritematoso sistémico	DR2, DR3
Miastenia gravis	DR3
Enfermedad de Grave	DR3
Hepatitis crónica autoinmune	DR3, DQ2
Soriasis	Cw6
Espondiloartropatía	B27

Respecto a HLA y cáncer, se han llevado a cabo diversos estudios de asociación en humanos, que han arrojado resultados muy variables en función principalmente de la localización geográfica del estudio. Muchos de estos trabajos sobre polimorfismo de los antígenos de histocompatibilidad y su asociación con enfermedades neoplásicas se han llevado a cabo en cáncer cervical. En tres de estos estudios se encontró asociación entre el alelo DQB1 *06 y aumento del riesgo a padecer la enfermedad (Ghaderi M et al., 2000, 2002; Dehaghani AS et al., 2002), aunque estos resultados no se han confirmado en trabajos realizados en otras áreas geográficas (Hamsiková E et al., 1999; Wu Y et al., 2007; Madeleine MM et al., 2002). Este mismo patrón de resultados se ha observado en otros tipos tumorales, como cáncer colorrectal (de Jong MM et al., 2005; Chatzipetrou MA et al., 1999; Lee JE et al., 1996) y cáncer de mama, donde los resultados publicados vuelven a ser dispares dependiendo fundamentalmente de la procedencia geográfica del grupo de estudio (Chaudhuri S et al., 2000; Subirá ML et al., 1979; Lindenberg P et al., 1986; Goepel JR et al., 1991; Gourley C et al., 2003).

4.4. Familia de genes MIC.

El descubrimiento de esta familia se debe a dos grupos de trabajo distintos; uno encabezado por Bahram en 1994 (Bahram S et al., 1994), quien le da el nombre de genes MHC class I (Chain-related genes MIC), por otro lado Leelayuwat y su grupo de investigadores, que también en 1994 descubren esta familia de genes, pero ellos les dieron el nombre de PERB (Leelayuwat C et al., 1994).

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

Posteriormente por convención internacional se acuerda nombrarlos de manera genérica genes MIC, aunque es importante señalar, que este acrónimo no define por completo la funcionalidad de esta familia de genes, ya que no son moléculas presentadoras de antígeno, su expresión está restringida a ciertos tejidos y no son inducidas por las mismas moléculas que para las moléculas clásicas del MHC (Mendoza Rincon FJ, 2007). Esta familia se compone de dos genes (MICA y MICB) y 4 pseudogenes, cuya ubicación se muestra esquemáticamente en la siguiente figura.

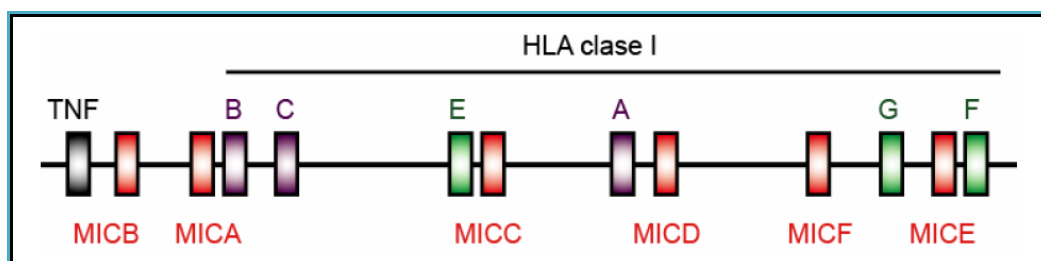


FIGURA 10: Ubicación de los genes de la familia MIC en la región de clase I del HLA. Se muestran los genes para las moléculas de clase I HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G, así como los dos genes (MICA y MICB) y cuatro pseudogenes (MICC, MICD, MICE y MIGF) de la familia MIC.

4.4.1. Estructura de los genes MIC.

Los genes MICA y MICB están localizados a 46,4 y 141,2 kb respectivamente del centrómero en dirección al locus del HLA-B en el cromosoma 6. Son inusualmente largos comparados con los genes del HLA, que tienen una longitud promedio de 3,5 kpb. Sin embargo, la estructura genómica general semeja aquella de los genes de clase I del MHC, donde distintos dominios están codificados por distintos exones (Barclay An, 1999). MICA posee un primer intron muy largo, donde existen sitios de unión para factores de transcripción como NF-KB (Molinero LL et al., 2004).

El gen de MICA codifica para un RNAm de 1382 nucleótidos (nt) que contiene un marco de lectura abierta de 1149 nt, originando un polipéptido de 383 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 43 kDa (Bahram S et al., 1994). Esta longitud varía de acuerdo al número de repeticiones de alanina del segmento transmembrana de diferentes alelos. El gen de MICB genera un transcrito de 2376 nt y un marco de lectura abierto de la misma longitud que MICA, con quien comparte un 83% de similitud de secuencia aminoacídica. La homología entre MICA y otros genes del HLA de clase I es muy baja, siendo del 15 al 21 % en el dominio $\alpha 1$, 19% al 30 % en el dominio $\alpha 2$ y 32 al 60 % en el dominio $\alpha 3$. Esta baja homología entre miembros de la familia de genes MIC y los genes de clase I del HLA es reflejo de una diversificación muy temprana en la evolución.

El polipéptido de MICA neosintetizado de 383 aa, contiene un péptido líder para traslocación al retículo endoplásmico, tres dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, un segmento

hidrofóbico de transmembrana y una cola citoplasmática relativamente corta. En células epiteliales polarizadas se observa que la cola citoplasmática dirige a esta molécula a la superficie basocelular (Suemizu HM et al., 2002). El dominio $\alpha 3$ carece de la secuencia de unión al correceptor CD8. La presencia de 8 sitios de N-glicosilación en MICA y 5 en MICB, contrasta con el único sitio de glucosilación de las moléculas clásicas de clase I, el que a su vez está ausente en MICA y MICB. La proteína MICA nativa está altamente glicosilada, lo que incrementa su peso molecular de 43 (péptido desnudo) a 65 KDa (proteína madura). Además, no requiere de $\beta 2$ -microglobulina ni del procesamiento antigénico o de las proteínas TAP para su expresión en superficie (Groh V et al., 1998; Zwirner NW et al., 1998).

La estructura cristalina de MICA ha revelado algunas características inusuales para una molécula codificada en el MHC de clase I (Li P et al., 1999). Se confirmó que MICA no está asociada a la $\beta 2$ -microglobulina y se observó que la posible hendidura de enlace del péptido es demasiado estrecha para acomodar un ligando, lo que sugiere que MICA no es una molécula presentadora de antígenos.

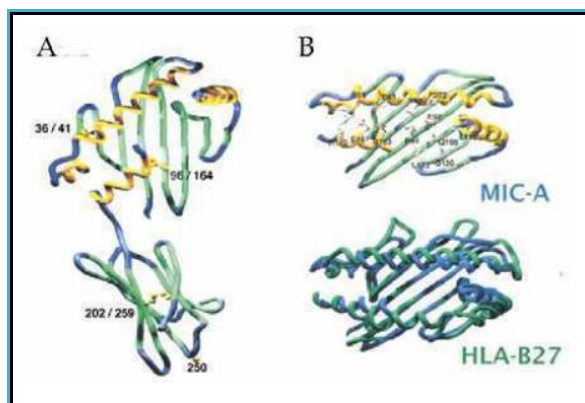


FIGURA 11: Estructura cristalográfica de MICA: a) La estructura de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ responden a la estructura general de las moléculas de clase I del MHC, pero b) la hendidura formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es demasiado estrecha para contener un péptido, comparado con la molécula clásica HLA-B27.

4.4.2. Polimorfismo de MICA.

Al igual que los genes de clase I HLA, MICA y MICB son polimórficos y se expresan de forma codominante (Moliner LL et al., 2002), conociéndose hasta la fecha más de 60 alelos de MICA y 30 alelos de MICB. La mayoría de los sitios polimórficos varían en posiciones nucleotídicas no redundantes, con predominancia en los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Una lista actualizada de los alelos de MICA y MICB se encuentra en el sitio de internet de la agrupación inglesa *The Anthony Nolan Trust* (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>).

La gran divergencia entre MICA y MICB reside dentro de los respectivos exones del segmento transmembrana. A diferencia de MICB, MICA posee variaciones en el número de repeticiones de la secuencia en tándem GCT, que codifica para diferente número de alaninas (Mizuki N et al., 1997). Basado en el número de estas repeticiones, los alelos se denominan A4,

A5, A6, A7, A9, A10 y A5.1. Éste último es idéntico al A5 excepto que posee una inserción (G) que genera un corrimiento del marco de lectura y un codón de terminación prematura dentro de la región transmembrana (Ota M et al., 1997). No obstante, la proteína codificada se expresa eficientemente en la superficie celular, donde puede unirse a NKG2D (Groh V et al., 1996; Zwirner NW et al., 1998). Los alelos que tienen esta mutación se localizan aberrantemente en células polarizadas, lo cual puede limitar el reconocimiento por NK y células $\gamma\delta$ en el epitelio intestinal durante la inmunovigilancia contra infecciones o neotransformaciones (Suemizu H et al, 2002).

TABLA 3: Variantes transmembrana y su correlación con alelos MICA (Collins RW, 2004).

Number of exon 5 GCT repeats	Codons 291–304	MICA* alleles
4 (A4)	AVAAAAIFVIIIIFY	001, 00701, 01201, 029, 043, 045, 051
5 (A5)	AVAAAAAIFVIIIIFY	010, 016, 019, 027, 033, 048
5 (A5.1)–G insertion after 2nd GCT repeat	AVAAGCCYFCYYYFLCPLLX	00801, 00802, 023, 028
6 (A6)	AVAAAAAIFVIIIIFY	004, 006, 009, 011, 026, 047, 049
7 (A7)	AVAAAAAIFVIIIIFY	050
9 (A9)	AVAAAAAIFVIIIIFY	00201, 041, 046
9 (A9)–G deletion at start of exon 5	LLLLLLLLLLLLLFLFLFSTS	015, 017
10 (A10)	AVAAAAAIFVIIIIFY	020

Los alelos más frecuentes en diferentes grupos étnicos son MICA*008, seguido por MICA*002, MICA*004 y MICA*010, dependiendo de las poblaciones (Petersdorf EW et al., 1999). Los genes MIC parecen no ser esenciales para la vida, ya que por una delección en la región de MHC, el 0,1024% de la población japonesa carece completamente del gen MICA y el gen MICB contiene un codón de terminación prematuro (Komatsu-Wakui M et al., 1999). A diferencia de las graves consecuencias de la ausencia de genes funcionales de clase I o clase II de MHC, los individuos MIC-/- son aparentemente normales. Esto podría deberse a que existe redundancia en los ligandos de NKG2D (NKG2DL) y así en caso de que las proteínas MICA y MICB estén ausentes, su función podría ser reemplazada por otro ligando, como las ULBPs.

4.4.3. Función biológica de MICA.

MICA tiene un patrón de expresión restringido a células endoteliales, queratinocitos, monocitos y epitelio gastrointestinal (Groh V et al., 1996; Zwirner NW et al., 1998). Posteriormente, se demostró que MICA también se expresaba en tumores de diferentes histiotipos, algunos melanomas y líneas celulares de leucemias T, y en timo (Groh V et al., 1999; Pende D et al., 2002; Hüb S et al., 2003). La detección de MICA en tumores sugiere que su expresión podía estar relacionada con el proceso de neotransformación. MICA no se expresa en linfocitos T o B en reposo.

Su receptor es otra molécula de la superficie celular que pertenece a la familia de los receptores de lectinas tipo C, llamado NKG2D (Bauer S et al., 1999). Se expresa principalmente en todas las células NK humanas, linfocitos $\gamma\delta$ y linfocitos $\alpha\beta$ CD8+, siendo una glicoproteína de membrana tipo II con un peso molecular de 42kDa, que presenta menor homología con

otros miembros de la familia de receptores NKG2D. NKG2D se expresa en la superficie celular como un homodímero asociado con una proteína adaptadora llamada DAP10 (Wu J et al., 1999), la cual es necesaria para obtener la actuación de una cascada de transducción específica de señal que lleva a la unión con MICA (Vivier E et al., 2002, 2004; André P et al., 2004; Billadeau DD et al., 2003).

En la región 5' del gen MICA se ha demostrado la existencia de un elemento regulador de la respuesta al choque térmico, similar al que se encuentra en el gen de la proteína de choque térmico de 70kDa (hsp70). Consecuentemente, la expresión de MICA es regulada por diversos estímulos de estrés. Se induce por choque térmico (Groh V et al., 1996) y estrés oxidativo (Yamamoto K et al., 2001) en líneas de carcinomas humanos. También se ha documentado su inducción en fibroblastos y células endoteliales infectadas *in vitro* con citomegalovirus (CMV) (Groh V et al., 2001). En este sentido, es interesante destacar que las células infectadas con este virus escapan al reconocimiento por células T debido a que expresan productos virales que impiden el procesamiento de antígenos y la expresión de moléculas de clase I del MHC. Sin embargo, el virus facilita el reconocimiento a través de NKG2D, lo que aumenta fuertemente la respuesta de células citotóxicas T $\alpha\beta$ CD8+ específicas del virus (Yewdel JW y Hill AB, 2002). No obstante el aumento de los NKG2DL se ve contrarrestado ya que la proteína viral UL16 es capaz de producir una disminución en la expresión de MICB y los ULBP -1 y -2 (Wu J et al., 2003; Rölle A et al., 2003). Además el CMV es capaz de inducir la degradación de MICA. Llamativamente, el alelo más frecuentemente encontrado en diversas poblaciones, MICA*008 (que posee una inserción que genera un codón stop prematuro y una proteína trucada que carece de la porción citoplasmática, pero que mantiene su capacidad de estimular a las células NK) es resistente a esta degradación mediada por el virus (Zou Y et al., 2005). Por lo tanto, aquellas personas portadoras del alelo MICA*008 serían resistentes a la infección por CMV. De esta manera, la interacción con patógenos como el CMV durante el transcurso de la evolución pudo haber ejercido una presión selectiva para el desarrollo del polimorfismo de los genes MIC, así como también para la existencia de múltiples ligandos de NKG2D. La infección de células dendríticas y de líneas epiteliales con *Mycobacterium tuberculosis* también induce un aumento en la expresión de MICA en superficie *in vivo* e *in vitro* lo que les hace susceptibles al reconocimiento por NKG2D presente en linfocitos $\gamma\delta$. Este reconocimiento permite potenciar la respuesta celular dependiente de receptor de células T (TRC) contra antígenos no peptídicos y a superantígenos, por lo que en determinadas circunstancias MICA actuaría como molécula coestimuladora (Das H et al., 2001). Asimismo, la infección de líneas celulares epiteliales con bacterias del grupo de *Escherichia coli* también induce la expresión de MICA en superficie, e induce la liberación de IFN γ (Tieng V et al., 2002). La figura 12 resume los mecanismos anteriormente expuestos.

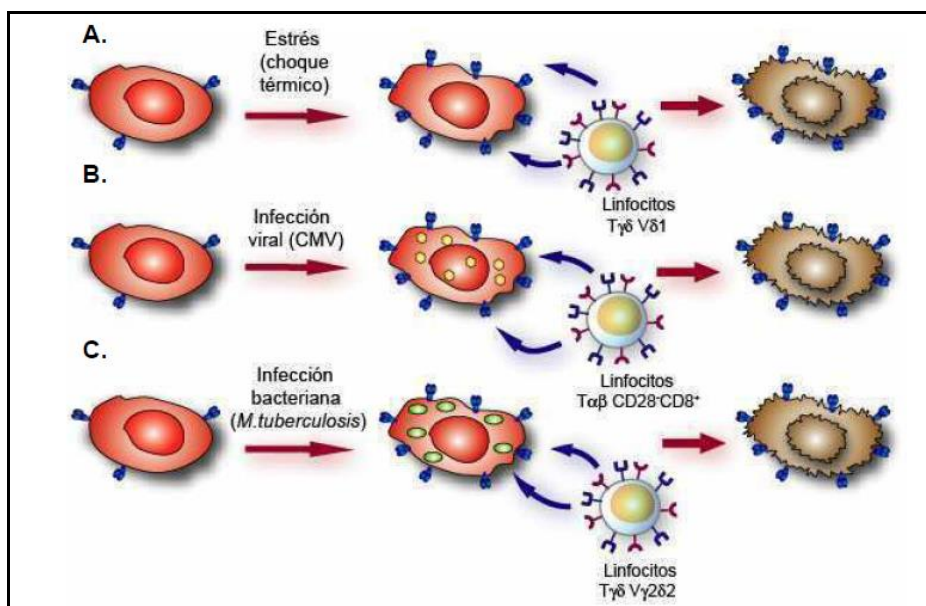


FIGURA 12: Expresión de MICA en diferentes situaciones.

4.4.4. MICA en la inmunología tumoral.

Se ha observado que carcinomas de mama, pulmón, ovario, próstata, colon, riñón y melanomas expresan altos niveles de MICA, por lo que se ha asociado la expresión de esta proteína a la neotransformación (Pende D et al., 2002; Groh V et al., 1999; Vetter CS et al., 2002). Asimismo, MICA se encuentra frecuentemente sobre-expresado en distintas líneas celulares tumorales. Si bien el anti-oncogen p53 está vinculado con la protección ante una transformación maligna (Vousden KH y Lu X, 2002), este supresor de tumores no parecía estar involucrado en la regulación de la expresión de MICA (Gasser S et al., 2005). Recientemente se ha demostrado que las células responden ante daños genotóxicos (altas dosis de radiación ionizante, tratamiento con inhibidores de la replicación del DNA o de la DNA polimerasa) induciendo la expresión de MICA y otros ligandos de NKG2D. Por lo tanto, la expresión constitutiva de NKG2DL en tumores, que generalmente poseen mutaciones, podría deberse a la activación crónica de las vías de reparación del DNA.

4.5. Moléculas LMP y TAP. Procesamiento antigénico.

El sistema inmunitario ha desarrollado mecanismos de defensa contra la invasión de los microorganismo cuyos constituyentes antigénicos se pueden encontrar, una vez producida la infección, tanto en el interior de la célula del huésped, como en el espacio extracelular. En este último caso, los determinantes antigénicos pueden ser de naturaleza u origen distintos. Las proteínas exógenas, solubles o insolubles, deben ser procesadas por las células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cell*). Las proteínas solubles son principalmente reconocidas y presentadas por los linfocitos B. En el caso de las insolubles, los fagocitos, en

especial los macrófagos y las células dendríticas, desempeñan el papel fundamental de procesamiento y presentación. En ambos casos, la presentación del antígeno al linfocito T se lleva a cabo mediante moléculas del MHC de clase II, expresadas en la superficie de la célula presentadora, y que es reconocida por el TCR de los linfocitos TCD4+.

Las proteínas de origen endógeno suelen ser presentadas en el contexto de moléculas de clase I, reconocidas por el TCR de los linfocitos TCD8+, aunque en determinadas circunstancias, también pueden procesarse y ser presentadas por células APC en el contexto de moléculas de clase II. Por último, se conoce, que ciertas estructuras de naturaleza lipídica pueden comportarse como antígenos. Estos suelen ser presentados por moléculas CD1.

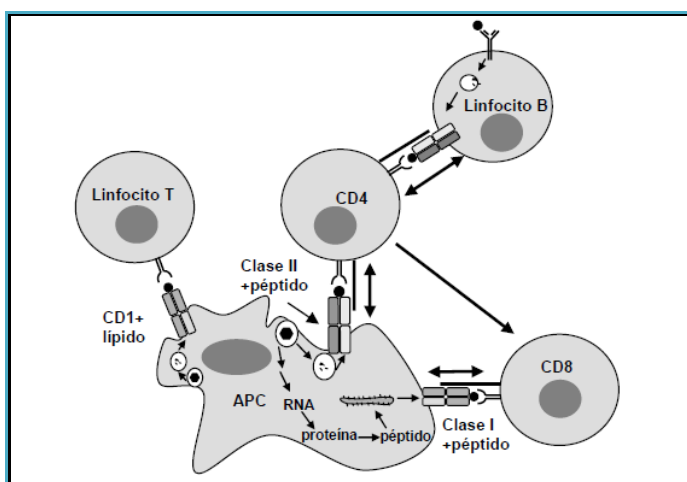


FIGURA 13: Esquema de la presentación del antígeno. La presentación antigénica puede realizarse mediante diferentes moléculas. Los péptidos pueden ser presentados en el contexto de moléculas de clase I y II, mientras que las moléculas CD1 están especializadas en la presentación de glucolípidos, pero no se sabe con certeza si estimulan a los linfocitos T *in vivo*. Aunque en el esquema se presentan los distintos contactos celulares posibles, es improbable que una misma APC establezca contactos simultáneos *in vivo*.

4.5.1. Procesamiento y presentación del antígeno por el MHC de clase I: implicación de LMP y TAP.

Las moléculas de MHC de clase I se expresan en la superficie de la mayoría de las células nucleadas y su función es la de presentar los antígenos a los linfocitos TCD8+.

La degradación de los antígenos citosólicos es un proceso esencial para la presentación del antígeno por las moléculas del MHC de clase I. Los antígenos extraños deben ser reconocidos y degradados por los enzimas proteolíticos de la célula presentadora de antígenos para generar péptidos de longitud apropiada para que puedan ser transportados a través de la membrana del retículo endoplásmico por el heterodímero TAP1, TAP2. En el retículo endoplásmico, los péptidos se asocian a las moléculas del MHC de clase I que han sido sintetizadas y transportadas hasta el retículo endoplásmico. Así se forma el complejo tri-

molecular (cadena pesada-B2-microglobulina-péptido) estable que es transportado a la superficie celular.

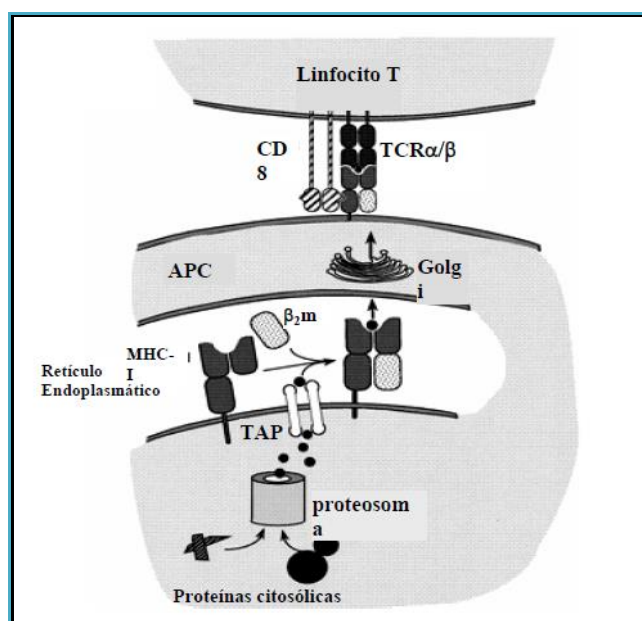


FIGURA 14: Presentación antigénica por el MHC de clase I. El ensamblaje del péptido cargado en las moléculas de clase I es reconocido por el receptor TCR α/β de los linfocitos TCD8+. Los péptidos son derivados de las proteínas citosólicas degradadas por los proteosomas y transportados dentro del RE por el transportador TAP.

4.5.1.1. Proteosoma y generación de péptidos.

La generación de péptidos de origen endógeno es el resultado de la actividad de diferentes proteasas localizadas tanto en el citosol como en el retículo endoplásmico. El proteosoma es la estructura que contribuye predominantemente a la generación de péptidos susceptibles de ser transportados al RE y asociarse a las moléculas del MHC de clase I. El grupo de Rock y colaboradores (1994) (Rock KL et al., 1994) fue el primero en demostrar que los proteosomas mediaban en la degradación de la mayoría de las proteínas endógenas citoplasmáticas. En estos experimentos, se demostró que en las células tratadas con inhibidores proteosómicos, las moléculas del MHC de clase I quedaban retenidas en el retículo endoplásmico debido a la ausencia de péptidos.

Tradicionalmente se ha pensado que los sustratos específicos de los proteosomas eran proteínas a las que se había unido una cadena de ubiquitina. Actualmente, se han descubierto tres enzimas diferentes (E1, E2 y E3) que llevan a cabo el proceso de ubiquitinación. Su actividad culmina en la unión de múltiples ubiquitininas a los residuos lisinas de las proteínas que deben ser eliminadas (Hershko A y Ciechanover A, 1998). El proteosoma degrada las proteínas ubiquitinadas dando lugar a péptidos de 3 a 30 aminoácidos (Hirsch C y Ploegh HL, 2000). Así pues, la unión de las moléculas de ubiquitina a las proteínas susceptibles de ser degradadas, era la señal necesaria para la digestión y consiguiente generación de péptidos en

el proteosoma. Sin embargo, recientemente se han descubierto también sustratos no ubiquitinados (Verma R y Deshaies RJ, 2000; Sheaff RJ et al., 2000).

Los proteosomas, también referidos como proteasas multicatalíticas, contienen un núcleo 20S que es activo proteolíticamente y puede degradar proteínas de forma ATP-independiente. El proteosoma 20S está formado por 28 subunidades distintas organizadas en cuatro anillos alrededor de un canal central donde tiene lugar la proteólisis. Los dos anillos externos contienen siete subunidades α cada uno, cuya participación es necesaria para el ensamblaje de la partícula. Los dos anillos más internos contienen siete subunidades β cada uno, de las cuales tres están implicadas en la proteólisis. De esta forma, cada proteosoma contiene seis sitios activos (Baumeister W et al., 1998).

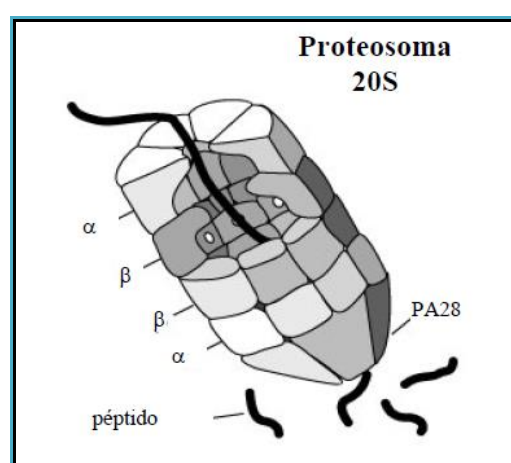


FIGURA 15: Estructura de un proteosoma. El proteosoma genera fragmentos peptídicos a partir de proteínas citosólicas captadas a través de las subunidades α del proteosoma. La proteólisis ocurre en la cavidad central que está formada por dos anillos con siete subunidades β cada uno.

El complejo cilíndrico 20S fue aislado unido a otras dos unidades, un complejo ATPasa (19S) y complejo proteosómico PA28 (11S). El conjunto de estas subunidades forman el complejo 26S y estas subunidades adicionales permiten el acceso del sustrato al interior del complejo 20S (Pamer E y Cresswell P, 1998). El proteosoma 26S contiene el *core* 20S y subunidades adicionales que incrementan su masa y pueden degradar proteínas totales y sustratos ubiquitinizados de forma ATP-dependiente (Johnson PR y Hochstrasser M, 1997). El complejo proteosómico PA28 se localiza en ambos extremos del proteosoma 20S (Gray CW et al., 1994) y juega un papel activador en el procesamiento del antígeno.

Las proteínas **LMP2** y **LMP7** pertenecen a la familia de las subunidades proteosómicas β (Martinez CK y Monaco JJ, 1991). El nivel de expresión de estas dos subunidades varía en los distintos tejidos (Brown MG et al., 1993) y es inducida por el interferón gamma (IFN γ) (Ortiz-Navarrete V et al., 1991). En las células activadas por el IFN γ se observó que había un desplazamiento, en el proteosoma 20S, de las subunidades X (MB1) e Y (delta) que son constitutivas, por las subunidades LMP7 y LMP2 (Belich MP et al., 1994). Posteriormente se

encontró una tercera subunidad proteosómica inducida por el IFN γ , denominada MECL-1 (LMP10), la cual reemplaza a la subunidad Z. La localización de estas subunidades en la región cromosómica de clase II y su inducción por el IFN γ hizo pensar que podrían jugar un papel en la presentación del antígeno. Se ha sugerido que este cambio en los componentes del proteosoma incrementaba la variedad de péptidos que podrían ser producidos dentro de una célula (Nandi De et al., 1996). Esto se confirmó realizando experimentos en animales que carecían de subunidades LMP para ver su implicación en la presentación de antígenos. Los ratones que carecen de LMP7 muestran una expresión reducida de MHC de clase I. Igualmente los ratones que carecen de LMP2 son menos eficientes en la presentación de un antígeno del virus de la gripe (influenza) y muestran una respuesta citotóxica pobre frente a este antígeno *in vivo*, aunque sí expresan niveles normales de las moléculas de clase I del MHC. Parece ser que estas subunidades del proteosoma no son esenciales para el proceso de la presentación del antígeno por clase I, aunque sí lo incrementan (York IA et al., 1999).

4.5.1.2. Transporte peptídico y ensamblaje dentro del retículo endoplásmico.

a) El transportador **TAP**.

TAP es una proteína heterodímera formada por dos subunidades TAP1 y TAP2, cuyos genes codificantes se encuentran en la región cromosómica del MHC de clase II (Monaco JJ, 1992). Cada subunidad TAP tiene una región hidrofóbica N-terminal y un dominio de unión a ATP C-terminal citosólico. TAP1 y TAP2 pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC, formada por proteínas de membrana transportadoras de diversas moléculas cuya función es dependiente de ATP. Todas las proteínas ABC contienen el motivo Walker A GX4BX[ST], el motivo Walker B [RK]X3GX3L[hidrofobico]3 y el motivo Walker C [LIVMFY]S[SG]GX3[RKA][LIVMYA]x[LIVFM][AG] (Walker LE y Reisfeld RA,). A partir de los análisis de hidrofobicidad y de los alineamientos de secuencia con otros transportadores ABC relacionados, se dedujo el modelo básico de la proteína TAP. Su estructura está formada por seis dominios transmembrana más tres o cuatro hélices adicionales predecidas para las diferentes regiones amino-terminales. Los dominios transmembrana se encuentran unidos a los dominios de unión a nucleótidos, que a su vez contienen los motivos Walker A y B, localizados en el citosol y necesarios para la unión e hidrólisis de la molécula ATP. El dominio C interacciona directamente con el último *loop* citosólico (E) de los dominios transmembrana (Lankat-Buttgereit B y Tampé R, 1994).

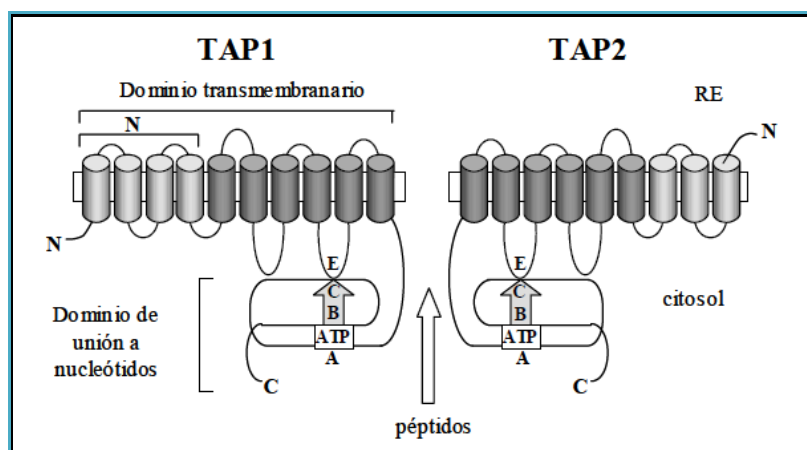


FIGURA 16: Estructura del transportador TAP. El dominio N-terminal de TAP1 y TAP2 es muy hidrofóbico y está formado por cuatro o tres hélices transmembranarias. El dominio de unión a nucleótidos consta de los motivos Walker A y B (A, B) y motivo Walker C que interacciona con el motivo E presente en el último *loop* citosólico de los dominios transmembranarios.

En la primera etapa del transporte se produce una asociación biomolecular en el cual el péptido se une a la molécula TAP independientemente de ATP. Seguidamente tiene lugar la isomerización del complejo TAP, desencadenando la hidrólisis del ATP y la translocación del péptido a través de la membrana.

La actividad ATPásica es específica de sustrato, habiéndose demostrado en numerosos estudios el transporte selectivo de los péptidos de 8-12 aminoácidos mediado por TAP a través de la membrana del retículo endoplásmico (Androlewicz MJ y Cresswell P, 1994).

Los estudios de transfección en RMA-S, una línea celular murina de linfocitos T mutada para el gen *tap2*, y en las células humanas con mutaciones en los genes *tap*, han establecido que el ensamblaje y la presentación del antígeno defectiva en estas células, es corregida por la adecuada expresión de las proteínas TAP (Spies T y DeMars R, 1991; Powis SJ et al., 1991). También, se ha observado que los ratones *knock out* para el gen *tap1* no son capaces de presentar antígenos citosólicos a los linfocitos TCD8+. Además, debido a la ausencia de expresión de moléculas clase I del MHC en su superficie, estos ratones carecen de linfocitos TCD4-8+ (Van Kaer L et al., 1992). Otras evidencias muestran, que en las células *tap*-negativas, el transporte peptídico dentro del retículo endoplásmico está mediado por una secuencia señal N-terminal. Además, se conoce la existencia de una familia homocigótica *tap2*^{-/-} en la cual se ve reducida la expresión de moléculas de MHC de clase I en la superficie celular y la cantidad de linfocitos T citotóxicos. Sorprendentemente, estos individuos no muestran un incremento en la susceptibilidad de las infecciones víricas. Los antígenos parecen que son transportados al interior del retículo endoplásmico de forma independiente de TAP, aunque en condiciones normales TAP parece ser la vía predominante (De la Salle H et al., 1997). En algunos tejidos tumorales se ha observado una disminución en la expresión del ARNm de *tap*, o también mutaciones de *tap*, sugiriendo que la supresión de la expresión de *tap* puede ser un

mecanismo utilizado por las células tumorales para escapar de la respuesta inmunitaria (Seliger B et al., 1997).

b) Papel de las moléculas acompañantes en el ensamblaje.

Además de las ya mencionadas, el ensamblaje y la carga de las moléculas del MHC de clase I requiere de otras proteínas. Al menos existen cuatro proteínas (calnexina, calreticulina, ERp57 y tapasina), que están involucradas en el ensamblaje de la cadena pesada y de la cadena β 2-microglobulina (Koopmann JO et al., 1997).

La principal molécula involucrada en el ensamblaje de las moléculas de clase I es la calnexina. Esta proteína transmembranaria del retículo endoplásmico comparte con la calreticulina, una proteína homóloga y soluble, la propiedad de unirse a los glicano monoglicosilados (Hammond C y Helenius A, 1995). La calnexina se asocia a la cadena pesada libre y posteriormente se produce la asociación con la cadena β 2-microglobulina. Una vez unida la cadena pesada de MHC de clase I con la cadena β 2-microglobulina, es la proteína soluble calreticulina la que se encuentra unida el heterodímero del MHC clase I. También se ha observado la existencia de una proteína de 48KD asociada a TAP y denominada tapasina (Sadasivan B et al., 1996), que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En las células tap-negativas, tanto tapasina, como los dímeros clase I- β 2-microglobulina están asociados a la calreticulina. Esto sugiere que, en las células normales, la tapasina podría hacer de puente entre el complejo calreticulina-cadena pesada- β 2-microglobulina y la molécula TAP (Figura 17) Las moléculas de clase I interactúan con el complejo TAP mediante la tapasina. Las funciones de la molécula tapasina son las de aumentar los niveles de TAP incrementando así la eficacia del transporte peptídico y asociarse con las moléculas de clase I facilitando el ensamblaje y la carga de éstas.

La proteína ERp57 es un miembro de la familia enzimática tioredoxina. Estos enzimas catalizan la isomerización de los puentes de sulfuro de las proteínas, asegurando las correctas uniones intracatenarias o intercatenarias. Estos enzimas son denominados tiol-oxidoreductasas, porque pueden catalizar tanto la reducción como la oxidación de los puentes disulfuro dependiendo del potencial redox. Se ha sugerido que la formación de los puentes disulfuro se inicia cuando las cadenas pesadas de clase I están asociadas con la calnexina y se completa después de la unión a la molécula β 2-microglobulina y la asociación con la calreticulina, siendo ERp57 la tiol-oxidoreductasa que facilita esta formación (Cresswell P et al., 1999).

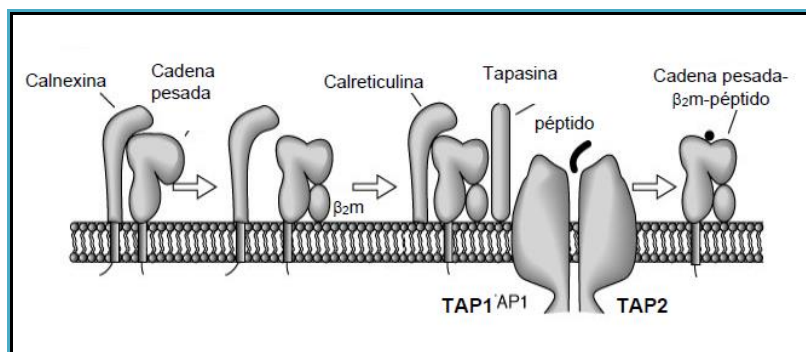


FIGURA 17: Asociación del péptido con el MHC de clase I.

c) Presentación antigénica independiente de TAP.

Aunque los proteosomas son los principales responsables de la generación de la mayoría de los péptidos presentados por clase I, otras proteasas también pueden generar péptidos antigénicos susceptibles de ser presentados por moléculas de clase I. Quizás la evidencia más clara de la generación de péptidos independientemente de los proteosomas es la presentación de los péptidos derivados de las secuencias señal. Estas secuencias son liberadas de las proteínas cuando éstas son traducidas y transportadas a su vez dentro del retículo endoplásmico, donde una peptidasa separa el péptido de la proteína. Hay varios ejemplos de estos péptidos o proteínas que pueden ser presentadas por el MHC de clase I. De hecho, la molécula HLA-A2, en ausencia de TAP, es capaz de presentar péptidos. Las moléculas de clase I no clásicas como HLA-E y Qa también se unen a las secuencias señal, pero en este caso, la presentación es dependiente de TAP, aunque no se bloquea por los inhibidores proteosómicos (York IA et al., 1999).

Las moléculas CD1 no están codificadas en el MHC, pero comparten características estructurales comunes con las moléculas MHC de clase I y también están asociadas a la proteína β 2-microglobulina (Melián A et al., 1996; Jayawardena-Wolf J y Bedelac A, 2001). Como las moléculas de clase I, CD1 requiere de la β 2-microglobulina para el transporte a la superficie celular. Sin embargo, el transporte de CD1 a la superficie parece ser independiente de TAP (Brutkiewicz RR et al., 1995). Estas moléculas, presentan a los linfocitos T, ligandos glucolipídicos.

4.6. Otras moléculas relacionadas con el sistema inmune y el MHC: NKG2D y CTLA-4.

4.6.1. El receptor **NKG2D**.

NKG2D fue identificado por primera vez en 1991 por Houchins y colaboradores, como un DNA complementario (cDNA) expresado por células NK humanas (Houchins JP et al., 1991). El papel de esta molécula fue ignorado hasta 1999, cuando NKG2D fue identificado como receptor de una molécula relacionada con el MHC de clase I, MICA (MHC class I chain related

A) (Bauer S et al., 1999). Desde entonces, NKG2D y sus ligandos fueron objeto de intensa investigación.

NKG2D es una molécula de transmembrana de tipo II que pertenece a la familia de las lectinas de tipo C. A diferencia de otros miembros de la familia NKG2, NKG2D no se asocia con CD94 y se expresa en forma constitutiva como homodímero en superficie celular en todas las células NK y linfocitos T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ CD8+. Este homodímero se une a la proteína adaptadora DAP10 en humanos y a DAP12 o DAP10 en ratones (Wu J et al., 1999; Chang C et al., 1999). La proteína DAP10 no contiene motivos ITAM, pero tiene un motivo YxxM, que está implicado en la unión a la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y a Grb, mientras que DAP12 contiene un motivo ITAM citoplasmático que recluta y activa a las tirosin-quinazas Syc o ZAP-70, que disparan una cascada de eventos que desembocan en el desarrollo de la citotoxicidad. Por otra parte, su expresión aumenta además por el efecto de IL-12 e IFN α en células NK y por IL-15 en linfocitos TCD8+ (Moser JM et al., 2002; Wu J et al., 1999; Roberts AI et al., 2001; Ho EL et al., 1998). NKG2D puede actuar como molécula coestimuladora en células NK cuando éstas reciben señales de activación a través de NKp30, NKp46 o NKp80, o como estructura primaria de reconocimiento de ligando sobre células blancas (Bryceson YT et al., 2006). Esta función dual hace que NKG2D sea una molécula muy versátil (Diefenbach A et al., 2002; Long EO, 2002; Gilfillan S et al., 2002), clave durante respuestas inmunes innatas y adaptativas. La estimulación de células NK a través de NKG2D gatilla una señal tan intensa que es capaz de sobrepasar a la señal inhibitoria disparada por el reconocimiento de moléculas de clase I de MHC por parte de los receptores inhibitorios KIRs conduciendo a la lisis de la célula blanco.

4.6.1.1. NKG2D e inmunidad anti-tumoral.

Actualmente sabemos que las poblaciones celulares linfocitarias efectoras de una respuesta anti-tumoral son los linfocitos T citotóxicos (con TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$) y las células NK, las que forman parte de los infiltrados linfocitarios que se detectan en los tumores (TILs: *tumor infiltrating lymphocytes*). Por otra parte, conocemos la existencia de variados mecanismos de escape tumoral (Rabinovich GA et al., 2007).

Se han publicado recientemente algunas revisiones acerca de cómo debería abordarse la potenciación de la respuesta inmune contra las células tumorales (Ward S et al., 2002; Foss FM, 2002; Busche A et al., 2006; Swann JB y Smyth MJ, 2007), pero las estrategias de inmunoterapia anti-tumoral ensayadas hasta el presente con este receptor, no han conducido a resultados clínicos exitosos (Pérez-Díez A y Marincola FM, 2002). El desafío para los inmunólogos consiste pues en comprender los mecanismos por los cuales los tumores evitan desencadenar una respuesta inmune eficiente y desarrollar nuevas estrategias de inmunoterapia o terapia génica que conduzcan al disparo de señales de activación inmune óptimas y la eliminación de factores responsables del escape tumoral, la reaparición de los tumores primarios y las metástasis. Por otra parte, muchas de las terapias actualmente

empleadas llevan el desarrollo de reacciones autoinmunes, tal como es el caso del vitíligo observado en pacientes con melanoma que recibieron transferencia de linfocitos T citotóxicos propagados *ex vivo* (Swann JB y Smyth MJ, 2007; Dudley ME et al., 2002).

Experimentos *in vitro* han demostrado que las células NK son capaces de disparar una citotoxicidad NKG2D-dependiente contra células tumorales provenientes de tumores epiteliales y no epiteliales (Pende D et al., 2001, 2002). En algunos casos, NKG2D fue el único receptor involucrado en el reconocimiento de las células tumorales, por lo que las moléculas blanco reconocidas, en particular MICA, son de interés para su estudio exhaustivo como candidatas a ser empleadas en el desarrollo de estrategias de terapia génica o inmunoterapia anti-tumoral.

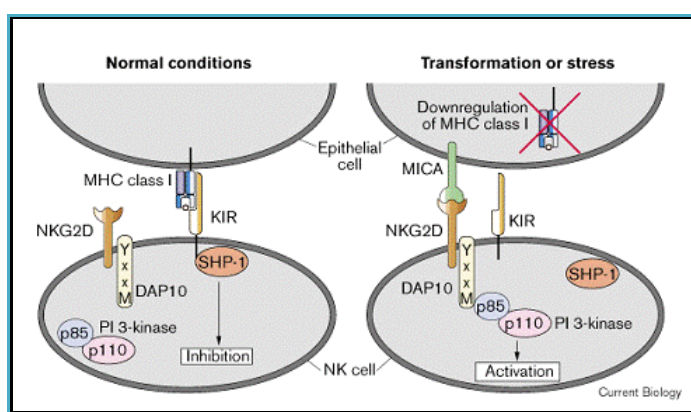


FIGURA 18: MICA en tumores: la expresión de MICA también es inducida por la neotransformación, y los tumores que expresan MICA pueden ser eliminados por células que expresan NKG2D, tales como las células NK y linfocitos TCD8+, contribuyendo a la inmunovigilancia.

En años recientes se han publicado dos estudios realizados en ratones en los que se investigó el papel de la molécula NKG2D como estructura de reconocimiento de células tumorales (Busche A et al., 2006; Diefenbach A et al., 2001; Cerwenka A et al., 2001). En uno de ellos, se demostró que la expresión ectópica de Rae 1 y H60 en células tumorales de ratón por transducción con adenovirus, induce el rechazo de los tumores *in vivo* en ratones singénicos de una manera NKG2D-dependiente, en un fenómeno mediado por células NK y linfocitos TCD8+ citotóxicos. El re-desafío de los animales sobrevivientes con los tumores transducidos o inclusive con los tumores salvaje, permitió demostrar que las células efectoras de la respuesta inmune anti-tumoral fueron los linfocitos TCD8+ citotóxicos y que el desafío original generó memoria inmunológica. Mas recientemente, utilizando un modelo murino humanizado de células de cáncer de pulmón transducidas y células NK humanas o murinas, se demostró que la sobre-expresión de MICA promueve una fuerte respuesta anti-tumoral. Asimismo, se ha demostrado que la sobre-expresión de ciertos NKG2D-Ls en líneas celulares derivadas de gliomas humanos, produce un crecimiento retardado de estas células en ratones atímicos (Friesen MA et al., 2003). Sin embargo, en este trabajo no se estudiaron los mecanismos involucrados en el crecimiento demorado de los tumores.

NKG2D, además de ser importante en el control y establecimiento de tumores y metástasis que expresan sus ligandos, protege al huésped de la iniciación de tumores, ya que la neutralización de NKG2D en ratones induce un aumento en la incidencia de tumores generados con carcinógenos químicos (Smyth MJ et al., 2005). Además, ratones que presentan una disminución sistémica de la expresión de NKG2D en células NK y linfocitos TCD8+ no son capaces de rechazar tumores que expresan MICA (Wiemann K et al., 2005). Recientemente se ha demostrado que los TILs de pacientes con melanomas expresan NKG2D y que este receptor es importante para el reconocimiento del tumor por parte de estos linfocitos (Maccalli C et al., 2007), reforzando la idea de que NKG2D es importante en la inmunidad anti-tumoral también en humanos. Pese a la expresión de NKG2D en TILs y de NKG2DL en diversos tumores humanos, éstos continúan con su desarrollo, lo que se debe a la existencia de diversos mecanismos de escape que comprometen a las células NK y más específicamente a NKG2D.

4.6.1.2. Mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL.

Hasta el momento se ha descrito diversos mecanismos que contribuyen al escape de la respuesta inmune mediada por células NK. Entre ellos se destaca la secreción de citoquinas inmunosupresoras (Glick AB, 2004), la expresión de isoformas solubles de HLA-G (Rouas-Freiss N et al., 2005) y el reclutamiento de Tregs al microambiente tumoral (Ghiringhelli F et al., 2005). Sin embargo, el hecho de que células tumorales que expresen altos niveles de NKG2DL sean altamente susceptibles al reconocimiento y destrucción mediados por NKG2D *in vitro*, y a la vez estén infiltrados por células NKG2D+ sugiere que existen mecanismos que *in vivo* alteran el normal reconocimiento y desarrollo de funciones efectoras por el sistema NKG2D-NKG2DL. Esto podría resultar en la selección de variantes tumorales que impiden este reconocimiento. En primer lugar se demostró que el ectodominio de MICA puede ser secretado *in vitro* al medio de cultivo y detectado *in vivo* en suero de pacientes con cáncer, lo que afecta la funcionalidad de células citotóxicas por interferencia en la interacción con el receptor NKG2D (Groh V et al., 2002; Salih HR et al., 2002). El clivaje involucra la acción de metaloproteasas y recientemente se ha demostrado que MICA se asocia en la superficie celular con la proteína ERp5 y que ésta interacción es requerida para el clivaje de MICA y la secreción del ectodominio soluble (Kaiser BK et al., 2007). El clivaje de MICA no solo genera variantes tumorales con baja expresión de MICA sino que induce la internalización de NKG2D en células NK y linfocitos T CD8+ y, consecuentemente una disminución de su expresión en superficie. De esta manera las células citotóxicas se ven impedidas de reconocer a las células tumorales. Otro mecanismo de escape que involucra al sistema NKG2DL-NKG2D es mediado por TGF β . Esta citoquina inmunosupresora (Wahl SM et al., 2006) tiene un doble efector sobre el sistema NKG2DL-NKG2D. Por un lado regula negativamente la expresión de MICA y otras NKG2DL en la superficie de células tumorales (Fries MA et al., 2004) y por otro lado induce una disminución en la expresión de NKG2D en linfocitos T CD8+ y células NK, lo que evita el reconocimiento y destrucción de distintos tipos celulares (Castriconi R et al., 2003; Smyth MJ et al., 2006) sin afectar la expresión de perforina y FasL (Lee JC et al., 2004). El TGF- β además de ser secretado por los tumores, es expresado en la superficie de las células Treg, que en el microambiente

tumoral inducen una disminución de NKG2D en las células NK. Recientemente se ha demostrado otro mecanismo de escape que evita el reconocimiento de los tumores por células NK en forma dependiente de NKG2D. Éste involucra la expansión selectiva de linfocitos T CD4+NKG2D+ en la sangre de pacientes con tumores. Esta población poco convencional de células tienen un fenotipo supresor, ya que la forma soluble de MICA (sMICA) no induce una disminución en la expresión de NKG2D en esta población (en oposición a lo que ocurre en linfocitos T CD8+NKG2D+) sino que la estimula para producir FasL soluble, lo que induce una expansión de las células T CD4+NKG2D+ con fenotipo supresor y un arresto del ciclo celular en linfocitos T CD4+NKG2D- y CD8+NKG2D- que serían los mediadores de la inmunidad anti-tumoral (Groh V et al., 2006). De esta manera, este mecanismo contribuye a que los tumores logren escapar al reconocimiento por el sistema inmune. Los mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL se encuentran resumidos en la siguiente figura.

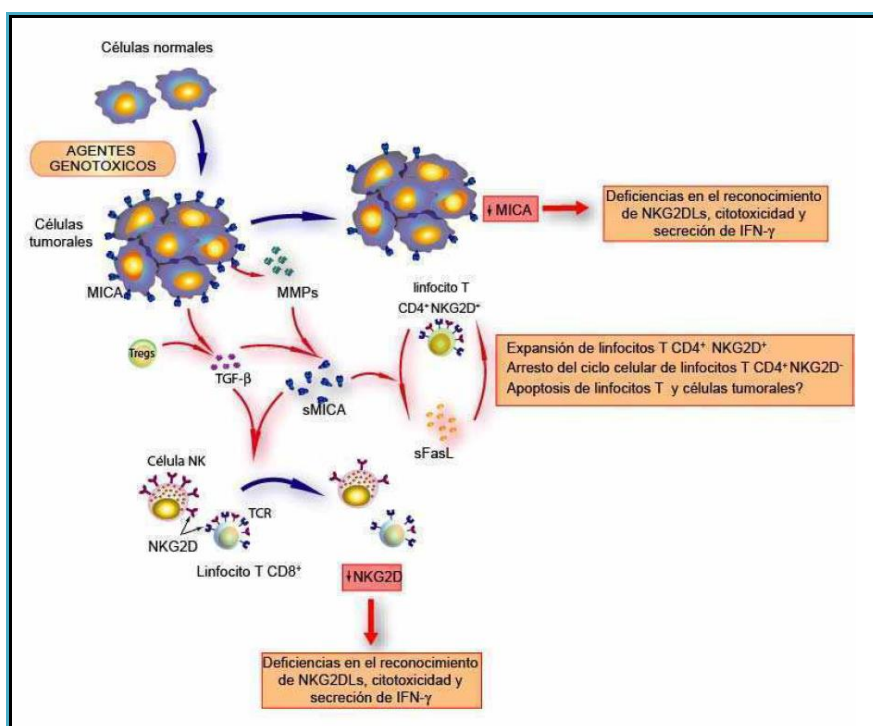


FIGURA 19: Mecanismos de escape tumoral que involucran a NKG2D y sus ligandos. Se muestran los tres mecanismos de escape que involucran a NKG2D descritos hasta el momento: MICA es clivada de la superficie de ciertos tumores por metaloproteasas (MMPs) y junto con TGF-β (secretado por el tumor y/o por células Treg) induce una disminución en la expresión de NKG2D en linfocitos T CD8+ y en células NK. Los tumores que expresan bajos niveles de NKG2DL son entonces deficientemente reconocidos por las células citotóxicas que además demuestran baja expresión de NKG2D. Además Fas soluble secretado por una población de células NKG2D+CD4+ supresoras induce la expansión autocrina de esta población e induce el arresto del ciclo celular de células CD4+NKG2D-.

4.6.2. El receptor **CTLA-4**.

El gen CTLA-4 (cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4), también conocido como CD152, es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y ha sido localizado en humanos, en el

Implicación de perfiles immuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

cromosoma 2 (Egen JG et al., 2002; Rudd CE y Schneider H, 2003). Este gen presenta cuatro exones: los exones 1 y 2 codifican la región extracelular de la molécula, mientras el exón 3 codifica la región transmembrana y el 4 la región intracelular (Ling V et al., 1999; Dariavach P et al., 1998). En relación con la evolución de esta molécula, CTLA-4 presenta un alto grado de conservación. El dominio intracelular de CTLA-4 está 100% conservado en mamíferos, mientras que el dominio extracelular presenta una variabilidad mayor. Esto sugiere la existencia de una presión selectiva en la conservación de los mecanismos que median la dimerización de CTLA-4 y la señalización a través de su dominio intracitoplasmático (Tefft WA et al., 2006; Ling V et al., 1999).

La molécula CD28 ha sido mapeada en la misma región cromosómica que CTLA-4 (Brunet JF et al., 1987; Dariavach P et al., 1998; Harper K et al., 1991; Lafage-Pochitaloff M et al., 1990; Alegre ML et al., 2001). Estas dos moléculas presentan una gran similitud estructural y homología en sus secuencias génicas, lo que les permite compartir los mismos ligandos –las moléculas B7-1 y B7-2- (Sharpe AH y Freeman GJ, 2002). Sin embargo, CTLA-4 se une a sus ligandos con mayor afinidad y avidéz que CD28 (Linsley PS et al., 1991, 1994). Esto sugiere que las señales inhibitorias son dominantes sobre las señales coestimuladoras. La alta avidéz de CTLA-4 por B7 se debe en gran parte a la estructura de homodímero de CTLA-4, que le permite unirse bivalentemente a B7 (Stamper CC et al., 2001), mientras que CD28 solo puede unirse monovalentemente a B7 (Collins AV et al., 2002; Van der Merwe PA y Davis SJ, 2003).

CD28 se expresa constitutivamente en los linfocitos T, por el contrario, CTLA-4 se expresa en la superficie de los Linfocitos T en reposo en niveles muy bajos, sólo a medida que el linfocito T se activa, los niveles de CTLA-4 en la superficie celular se elevan. La expresión de CTLA-4 a bajos niveles es suficiente para inducir una señal negativa en los linfocitos T (Vandenborre K et al., 1999); por esta razón su expresión está estrictamente regulada por dos mecanismos: el primero es la redistribución de las moléculas CTLA-4 que se encuentran en la región intracelular, el segundo es el incremento de sus síntesis (Frauworth KA y Thompson CB, 2002; Pioli C et al., 2000). La mayoría de las moléculas CTLA-4 se acumulan intracelularmente en lisosomas donde son degradadas rápidamente con el fin de regular su expresión (Iida T et al., 2000); solo un pequeño grupo de moléculas CTLA-4 se expresan en la superficie del linfocito T, pero de una manera muy dinámica. Esta distribución de CTLA-4 es regulada a través de una interacción del dominio intracitoplasmático de CTLA-4 con AP-1, el cual media el transporte de CTLA-4 desde el aparato de Golgi hasta la superficie celular (Schneider H et al., 1999). El transporte de CTLA-4 a endosomas y lisosomas para su almacenaje o degradación es mediado por la interacción de la molécula CTLA-4 que se encuentra en la superficie celular con AP-2; esta interacción sólo sucede cuando los residuos de tirosina del dominio intracitoplasmático de CTLA-4 no han sido fosforilados (Shiratori T et al., 1997; Bradshaw JD et al., 1997). De esta forma, en ausencia de estimulación, CTLA-4 será degradado, y en presencia de activación de TCR, CTLA-4 contenido en los lisosomas es secretado aumentando su expresión en la superficie celular. En el caso de los linfocitos T memoria, éstos tienen una gran

cantidad de CTLA-4 intracelular, el cual es expresado mucho más rápidamente en la superficie del linfocito T de memoria activado, en comparación con la velocidad de su expresión durante la activación de los linfocitos T vírgenes. Adicionalmente, CTLA-4 es retenido en la superficie del linfocito T de memoria activado un tiempo considerablemente más largo que en el caso del linfocito T virgen activado (Tefft WA et al., 2006; Jago CB et al., 2004).

Al igual que CD28 y CTLA-4, los patrones de expresión de las moléculas B7-1 y B7-2 en la superficie celular de la célula presentadora de antígenos (APC) son diferentes. B7-2 es expresada constitutivamente en las APCs y su expresión aumenta rápidamente después de la activación, alcanzando un pico de expresión a las 24 horas (Lenschow DJ et al., 1993; Fraser JH et al., 1999); por el contrario, la molécula B7-1 solo se expresa después de la activación, alcanzando un pico a las 47-72 horas. Con base a estas diferencias y a otros datos cristalográficos y moleculares, investigadores concluyen que B7-2 es el principal ligando de CD28 (coestimulador), y B7-1, el principal ligando de CTLA-4 (inhibidor) (Tefft WA et al., 2006).

Se han postulado dos mecanismos que median los efectos inhibitorios de CTLA-4: uno de ellos es la señalización negativa transmitida a través del dominio intracitoplasmático de esta molécula, que aumenta paralelamente a la activación del TCR; Actualmente no se conocen claramente las señales transmitidas por CTLA-4. Se han propuesto tres modelos para explicar los niveles en los que posiblemente actúa CTLA-4: inhibición temprana de las señales de activación inducidas por el TCR, inhibición de las señales de activación inducidas por el TCR y CD28, inhibición de las señales coestimuladoras dependientes de CD28 (Appleman LJ et al., 2000). Independientemente de la vía de señalización usada por CTLA-4, las señales transmitidas por esta molécula inhiben la acumulación de AP-1, NF- κ B y NFAT en el núcleo de los linfocitos T activados, disminuyendo de esta manera la síntesis de citoquinas (Fraser JH et al., 1999; Olsson C et al., 1999). CTLA-4 también regula la proliferación celular inhibiendo la ciclina D3, las ciclinas dependientes de cinasas 4 y 6 y la degradación del inhibidor del ciclo celular p27 (Brunner MC et al., 1999). Otros estudios han demostrado que CTLA-4 disminuye los niveles de actividad de ERK y JNK, induciendo de esta manera la inhibición de la síntesis de IL-2 (Calvo CR et al., 1997).

El segundo mecanismo propuesto es la inhibición de la activación celular debido al antagonismo competitivo de la coestimulación mediada por CD28. Las señales de activación en los linfocitos T permiten la reorientación de CTLA-4 que se encuentra en el espacio intracelular hacia la superficie celular y principalmente hacia las balsas esfingolípídicas para participar en la sinapsis inmunológica (Egen JG y Allison JP, 2002; Linsley PS et al., 1996). De esta manera, CTLA-4 está disponible para competir con CD28 por B7. Debido a su mayor afinidad, CTLA-4 secuestra moléculas B7 y reduce la cantidad disponible de coestimulación dependiente de CD28. A diferencia de la señalización negativa intracelular, este segundo mecanismo no requiere la presencia del dominio intracitoplasmático de CTLA-4 y está regulado por los niveles de expresión de CTLA-4 en la superficie celular. Este hallazgo explica por qué la expresión de CTLA-4 está finamente regulada y altamente compartimentalizada, puesto que la presencia de

altos niveles de CTLA-4 en la superficie celular podría inhabilitar al linfocito T para el desarrollo de una respuesta inmune. Sin embargo, numerosos estudios sugieren que el secuestro de moléculas B7 en la sinapsis inmunológica probablemente no es suficiente para bloquear las señales coestimuladoras del linfocito T.

Los linfocitos T anti-tumorales juegan un papel primordial en la inmunovigilancia contra las células transformadas. Se sabe que ratones con tumores trasplantados que se les inyectan anticuerpos que bloquean la actividad de CTLA-4, son capaces de eliminar el tumor, desarrollando una respuesta inmune anti-tumoral duradera (Puré E et al., 2005; Leach DR et al., 1996). Importantes grupos de investigación han publicado que el uso de anticuerpos que bloquean la actividad de esta molécula inmunosupresora produce una reducción del tumor en pacientes con melanomas metastásicos cuando se administra como inmunoterapia (Hodi FS et al., 2003; Phan GQ et al., 2003; Attia P et al., 2005). Ensayos clínicos y preclínicos han demostrado que el bloqueo de CTLA-4 puede ser una aproximación inmunoterapéutica prometedora para tratar pacientes con otros cánceres avanzados (Kwon ED et al., 1999; Thompson RH et al., 2006; O'Mahony D et al., 2007). Estos hallazgos sugieren que CTLA-4 juega un papel importante en el desarrollo y la progresión del cáncer.

Este gen es muy polimórfico, identificándose más de 100 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) (Ueda H et al., 2003; Ligiers A et al., 2001), como por ejemplo +49 adenosina/guanine (+49 A/G), +6230 G/A (CT60), -318 citosina/timina (-318 C/T) -1611 G/A, -1722 T/C, etc. Muchos de ellos han sido estudiados por su implicación con el riesgo de cáncer (rs 5742909) (rs3087243) (rs231775), indicando su relación con la etiología de varios tipos, incluyendo cáncer cervical (Ivansson EL et al., 2010; Rahimifar S et al., 2010), cáncer de pulmón (Sun T et al., 2008; Khaghanzadeh N et al., 2010), cáncer de mama (Wag L et al., 2007; Li H et al., 2008; Ghaderi A et al., 2004), hepatocarcinomas (Hu L et al., 2010), así como otros. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes. Igualmente también se ha establecido asociación entre polimorfismos de CTLA-4 y algunas enfermedades autoinmunes como tiroiditis de Hashimoto (Awata T et al., 1998), enfermedad de Grave's, lupus eritematoso sistémico (Barreto M et al., 2004; Lee YH et al., 2005), y diabetes mellitus tipo I como resultado de la destrucción inflamatoria de las células β pancreáticas productoras de insulina por una sobre-proliferación de linfocitos T.

5. Sistema inmune y cáncer de mama.

El cáncer de mama es el tumor más frecuente diagnosticado en la mujer, y la principal causa de muerte en ella por cáncer en el mundo desarrollado, representando un problema de salud mundial. Si bien, la mortalidad ha descendido en los últimos 25 años debido al diagnóstico en estadios iniciales con la implantación de programas de detección precoz y los avances y mejoras en el tratamiento de esta neoplasia. Hoy en día, la decisión de tratamiento, sobre todo en estadios iniciales, se sigue basando principalmente en factores pronósticos y predictivos tales como el tamaño del tumor, la afectación ganglionar, el grado histológico del

tumor, el estado hormonal y la expresión de HER2. Sin embargo, actualmente estos factores no aportan una óptima estratificación del riesgo de recaída. Por lo tanto, resultan necesarios otros factores adicionales con la idea de conseguir un tratamiento más personalizado para las pacientes con CM.

El CM, inicialmente no fue percibido como un tumor inmunogénico, cuando se comparaba con otras neoplasias como el melanoma o el carcinoma de células renales, donde se había usado durante años tratamientos con inmunoterapia con IL-2 con diferentes resultados. Sin embargo, actualmente se sabe que existen una gran variedad de reacciones inmunes en el CM.

El CM es una enfermedad que se mantiene latente por un periodo largo. En esa etapa, el sistema inmune puede inhibir el desarrollo de las células neoplásicas o hacer lo contrario y aceptarlas “como propias”. Por otra parte, esas células durante su crecimiento exhiben gran variedad de antígenos, característica que no favorece una respuesta determinada, escapando muchas células frente a las acciones del sistema inmune. Mutaciones secuenciales en el ADN de la célula tumoral inducen cambios en las concentraciones hormonales, en la producción de enzimas y citoquinas, así como en la expresión de nuevos antígenos, lo que posibilita que estas células transformadas escapen del control homeostático y se tornen resistentes a la destrucción mediada por los mecanismos de la respuesta inmune (Hadden JW, 1999).

Por lo tanto hoy se sabe que el CM es también un tumor altamente inmunogénico, existiendo fuertes evidencias de que la respuesta inmune adaptativa del huésped contra el tumor, juega un papel crucial en el control del crecimiento y la progresión del mismo (Zitvogel L et al., 2006). Por otro lado, las células del CM son capaces de adaptarse para escapar del sistema inmune y de ese modo adquirir características para evadir el reconocimiento inmunológico (Dunn GP et al., 2004).

Los linfocitos T citotóxicos (LTc) son capaces de reconocer antígenos asociados al tumor presentados por el MHC clase I en la superficie celular (Algarra I et al., 2004). Para evadir el reconocimiento inmune por los LTc, las células tumorales pueden perder la expresión de estas moléculas HLA de clase I. Sin embargo esto les hace más propensas al reconocimiento por parte de las células NK (Wischhusen J et al., 2007). Las moléculas HLA no clásicas (HLA-E y HLA-G) juegan un papel crucial en la inmunovigilancia por parte de las células NK. La expresión de estas moléculas en la superficie celular causa un efecto inhibitorio en el ataque de las células NK (Marín R et al., 2003; Khong HT y Restifo NP, 2002). Igualmente se ha demostrado en las células del CM, la liberación de formas solubles de MICA (sMICA), que interactúan con el receptor NKG2D, bloqueando la activación y el reconocimiento antigénico por parte de las células NK y los LTc. Otro mecanismo de escape tumoral de la inmunovigilancia del sistema inmune es la atracción y la inducción de células T reguladoras inmunosupresoras (Tregs) al microambiente tumoral (Cerwenka A et al., 2001). Todos estos hallazgos muestran las

complejas relaciones que tienen lugar entre las células tumorales del CM y las células del sistema inmune.

Otra evidencia de la existencia de la inmunovigilancia y del proceso de *immunoediting* en el CM es la correlación encontrada entre altos niveles de infiltración linfocítica del tumor y el bajo riesgo de recaída en pacientes que no reciben tratamiento adyuvante, independientemente del subtipo molecular, lo cual concuerda con la fase de *equilibrio* postulada dentro de la hipótesis del proceso de *immunoediting*. La asociación más consistente entre buen pronóstico e infiltración linfocítica del tumor en CM se ha visto en tumores triples negativos y Her2 negativos (Desmedt C et al., 2008; Rody A et al., 2009; Staaf J et al., 2010; Bianchini G et al., 2010).

La infiltración linfocítica del tumor se considera una manifestación más de la respuesta inmune del huésped. Y cada vez hay más evidencias de que es el tipo de célula inmune, más que la cantidad, la que regula la respuesta inmune del huésped contra el tumor. La mayoría de los TILs en tumores sólidos están formados por células TCD3+. Estas pueden dividirse en células CD4+ colaboradoras (incluyendo los subtipos Th1 y Th2, basado en su perfil de citoquinas), células CD4+ reguladoras (Treg) y células CD8+ citotóxicas. Los Treg son linfocitos T CD4+CD25+ derivados del timo, que de forma constitutiva expresan en su superficie el receptor CTLA-4 y secretan citoquinas inmunosupresoras como el TGFβ y la IL-10 (Nishikawa H y Sakaguchi S, 2010). Los Treg representan aproximadamente el 10% de todas las células TCD4+ y específicamente expresan el factor de transcripción FOXP3 (Fontenot JD et al., 2003; Hori S et al., 2003). Aunque se desconocen los mecanismos exactos de la acción inhibidora del sistema inmune de las células Treg, se ha visto que esta depende de la expresión del factor de transcripción FOXP3, el cual controla algunos genes que codifican proteínas como CD25, GITR, CTLA-4, entre otras, capaces de mediar la acción supresora de estas células. Además FOXP3 inhibe la producción de citoquinas efectoras como IL-2- (Gavin MA et al., 2007; Zheng Y et al., 2007; Vignali DA et al., 2008). Otros mecanismos de inmunosupresión provienen del contacto directo célula a célula con la APC vía TGFβ o CTLA-4 y la secreción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGFβ entre otras (Collison LW et al., 2009; De la Cruz-Merino L et al., 2009). Específicamente, en CM el número de células Treg CD4+CD25+ FOXP3 y el descenso del cociente de células TCD8+/FOXP3 se correlaciona con un peor pronóstico (Bates GJ et al., 2006). Aunque se pensaba que la expresión de FOXP3 se restringía a las células Treg, actualmente se sabe que este factor de transcripción también está presente en varios tipos de células tumorales, incluyendo el CM. Sin embargo, la implicación clínica de la expresión de FOXP3 en las células del CM es contradictoria (Merlo A et al., 2009; Ladoire S et al., 2012).

No cabe duda, por tanto, que el sistema inmune juega un papel muy importante en el desarrollo y progresión del cáncer de mama y que el resultado de esa interacción entre respuesta inmune y cáncer está relacionado con la salida y supervivencia de estos pacientes, sugiriendo así la existencia de factores pronósticos y/o predictivos de origen inmune en el CM,

además de los ya conocidos clásicos (como tamaño tumoral, afectación ganglionar, etc), que pueden ser usados como dianas terapéuticas.

En CM existen evidencias científicas robustas de que polimorfismos en estos genes implicados en el reconocimiento antigénico y la respuesta inmune, contribuyen a la susceptibilidad o bien a la protección de la enfermedad, así como el pronóstico de la misma. Por ejemplo, los alelos de HLA se han asociado a susceptibilidad o protección frente al cáncer de mama, con resultados diferentes en los distintos grupos estudiados, dependiendo del área geográfica. Así en el trabajo de Lavado y col realizado en pacientes con CM del sur de España, el alelo HLA-B7 se asoció con el desarrollo de la enfermedad (Lavado R et al., 2005), y sin embargo, los alelos HLA DRB1*1101 y HLA DQB1*03032 (relacionados en otros trabajos con protección frente al CM) no se asociaron con ningún grado de protección o susceptibilidad en la misma población de estudio, cuando se comparaba con controles sanos de la misma área geográfica (Chaudhuri S et al., 2000). De la misma manera, se sabe que el complejo NKG2D-major histocompatibility class I related chain A (MICA) juega un papel importante en la respuesta anti-tumoral. Se han descrito varios polimorfismos en la región transmembrana de MICA, uno de los cuales MICA 5.1 da lugar a una proteína truncada. Se ha visto que en el mismo grupo de pacientes del grupo de Lavado y col, este alelo parece incrementar el riesgo de CM en la población HLA-B7 (Lavado R et al, 2005).

Igualmente se han descrito polimorfismos y asociación con enfermedades autoinmunes, infecciosas y neoplásicas, con otros genes implicados también en el reconocimiento antigénico y la respuesta inmune anti-tumoral, tales como LMP, TAP, NKG2D y CTLA-4.

LMP y TAP son dos grupos de proteínas que participan en el procesamiento antigénico, jugando por tanto un papel muy importante en el sistema inmune del huésped en la defensa contra células infectadas por patógenos o células transformadas. Actualmente se sabe que una baja regulación de TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 condiciona una supresión en la expresión de moléculas del MHC de clase I en la superficie celular (Cromme FU et al., 1994; Maeurer MJ et al., 1995; Seliger B et al., 1996, 1997). Así mismo, déficit en la expresión de LMP y TAP se ha detectado en líneas celulares de una gran variedad de tumores (Seliger B et al., 1997). Estos genes son enormemente polimórficos y estas variaciones genéticas se han relacionado con enfermedades inflamatorias/autoinmunes (Krämer U et al., 2007; Dong Jun D et al., 2014; Deng GY et al., 1995), infecciosas (Huang P et al., 2014; Cui Q et al., 2010) y con el riesgo de determinadas neoplasias (Fellerhoff B et al., 2011; Cao B et al., 2005; Einstein MH et al., 2009; Ozbas-Gerceker F et al., 2013; Ma X et al., 2015; Zou N et al., 2015). Sin embargo estos genes no se han estudiado en el cáncer de mama, a pesar del conocimiento actual de la fuerte inmunogenicidad de este tumor en relación con otros.

Por otra parte se sabe que el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) de NKG2D Thr72Ala (A/G) (rs2255336), situado en la región que codifica la parte transmembrana de este

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

receptor, ha sido asociado a una disminución de la función del receptor en células NK y T en algunos trabajos (Roszak A et al., 2012). Igualmente su expresión también se ha relacionado como factor protector en algunas enfermedades autoinmunes y neoplásicas (Roszak A et al., 2012; Kabalak G et al., 2010; Piotrowski P et al., 2012). De la misma manera tampoco existe conocimiento del estudio de este punto polimórfico en tumores de mama.

Y finalmente, polimorfismos de nucleótido simple (SNP) del gen CTLA-4 también se han relacionado con el riesgo de neoplasias. Uno de ellos es el polimorfismo +49 A/G, denominado así porque se trata de un cambio (adenina-guanina) en la posición del nucleótido 49 en el exón 1 del gen CTLA-4, que da lugar a un cambio de aminoácido, de alanina a treonina. Algunos estudios han encontrado que este polimorfismo puede afectar la habilidad de CTLA-4 de unirse a B7.1 y por consiguiente la activación de la célula T (Sun T et al., 2008). También se ha relacionado con el riesgo de padecer determinados cánceres (Zheng J et al., 2010; Wang L et al., 2007). Otro de ellos es el -1661 A/G localizado en la región del promotor del gen, e igualmente asociado con la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias, autoinmunes, y algunos cánceres, entre ellos cáncer de mama (Yan Q et al., 2013).

Todos estos datos nos hacen pensar de la existencia de perfiles inmunogénéticos específicos de cada individuo y/o población, que ante la presencia de un patógeno (ya sea de origen infeccioso, tumoral, etc) serían responsables de una respuesta inmune citotóxica determinada, confiriendo al huésped o bien una protección frente al desarrollo final de la enfermedad, o bien susceptibilidad a la misma. Y precisamente el polimorfismo de los genes implicados en esta respuesta inmune, explicarían las diferencias observadas en las distintas áreas geográficas.

II.OBJETIVOS

1. Objetivo principal.

Evaluar perfiles inmunogenéticos de susceptibilidad y protección frente al cáncer de mama en nuestra área geográfica y su correlación con variables clínicas de la enfermedad.

2. Objetivos secundarios:

- 2.1. Estudiar la distribución de frecuencias de las variantes polimórficas de diferentes genes del sistema inmune, relacionados con la respuesta citotóxica antitumoral, en pacientes con cáncer de mama del Sur de España y en controles sanos de la misma área geográfica (HLA-B*, HLA-DRB1*, MICA-A, NKG2D, LMP, TAP y CTLA-4).
- 2.2. Comparar las frecuencias de las variantes polimórficas de los diferentes genes estudiados entre pacientes con cáncer de mama y controles sanos.
- 2.3. Establecer asociaciones de susceptibilidad o protección entre los genes del sistema inmune estudiados y el cáncer de mama en nuestra área geográfica.
- 2.4. Establecer correlaciones entre los diferentes perfiles inmunogenéticos analizados con variables clínicas de la enfermedad, así como los subtipos moleculares del cáncer de mama.

III. MATERIAL Y METODOS

1. Población de estudio.	57
1.1. Pacientes.	57
1.2. Controles.	57
1.3. Tamaño muestral.	57
2. Material.	57
2.1. Equipamiento.	57
2.2. Material fungible.	58
2.3. Soluciones.	59
2.4. Softwares y programas específicos.	59
3. Métodos.	60
3.1. Obtención y almacenamiento de las muestras de sangre periférica.	60
3.2. Extracción del ADN.	60
3.3. Cuantificación del ADN.	60
3.4. Preparación de las muestras de ADN.	60
3.5. Determinación de las variantes alélicas de los genes de clase I (HLA-B+) y clase II (HLA-DRB*).	61
3.6. Alelos del microsatélite de la región transmembrana de MICA.	64
3.7. Determinación de las variantes alélicas de los genes LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2.	68
3.8. Determinación de la variante polimórfica del gen NKG2D.	71
3.9. Determinación de las variantes polimórficas de CTLA-4.	75

4. Análisis estadístico de los resultados.

79

1. Población de estudio.

1.1. Pacientes.

Se incluyeron en el estudio de forma prospectiva un grupo de 200 pacientes con cáncer de mama, pertenecientes a la provincia de Málaga, diagnosticadas y tratadas entre diciembre 2008 y febrero 2013, en las diferentes unidades de Oncología Médica de los hospitales Regional Universitario de Málaga, Comarcal de Antequera, Comarcal de Vélez Málaga y Costa del Sol. Con un seguimiento máximo de 5 años, para la gran mayoría de ellas.

De cada paciente se obtuvo una muestra de sangre periférica de 15 ml, así como información clínica relevante sobre antecedentes personales y familiares, tipo de cáncer, tratamiento realizado y seguimiento (Ver ANEXO 1).

Todas las participantes fueron informadas del estudio y aceptaron ser incluidas en él, obteniendo su consentimiento informado según el modelo de formulario que se presenta en el ANEXO 2. Los criterios para la inclusión al estudio fueron:

- Mujer diagnosticada de cáncer de mama.
- Tiempo transcurrido desde el diagnóstico a la inclusión inferior a 1 año.
- De origen español.
- Procedente de la provincia de Málaga.

1.2. Controles.

Se incluyeron en el estudio un grupo de 169 controles sanos, donantes voluntarios de sangre, pertenecientes a la misma región geográfica que las pacientes, con similar edad y raza. El ADN de estos controles se encontraba conservado en una genoteca a -80°C en el servicio de Inmunología del Hospital Regional Universitario de Málaga.

1.3. Tamaño muestral.

El tamaño muestral empleado nos asegura una potencia del 70% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula ($H_0: P_1=P_2$) mediante una prueba de X^2 bilateral para dos muestras independientes, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5%, y asumiendo que la proporción en el grupo de referencia (controles) es del 15% y la proporción en el grupo experimental (casos) es del 250%.

2. Material.

2.1. Equipamiento.

- Agitador magnético (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España).
- Analizador de imagen y transiluminador Autochemi System, UVP. (Bioimaging System).
- Balanza de precisión (Mettler Plisoi-S, Toledo, España).
- Campana de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR, Barcelona, España).
- Centrífugas: Multifuge 3 L-R (Heraeus) y Heraeus Multifuge X3R (Thermo Scientific).
- Congeladores -80°C (Heraeus), monitorizados por el Biobanco Andaluz.
- Cubetas de electroforesis horizontal BioRad Wide Mini-Sub Cell GT (BIORAD).
- Equipos informáticos dotados de los programas necesarios para albergar las bases de datos y software de análisis estadístico.
- Extractor automático de ácidos nucleicos BIO ROBOT EZ1 (QIAGEN).
- Frigorífico Combi. Nevera 4°C y congelador -20°C. (Liebherr_International AG, Bulle, Suiza).
- Fuentes de electroforesis PowerPAC 3000 (Bio-Rad, California, Estados Unidos).
- Juegos de micropipetas Eppendorf Research Plus (p10, p100, p200 y p1000) (Eppendorf).
- Luminex LABScan TM 100.
- Microcentrifugas: Centrifuge 5424 (Eppendorf) y Biofuge Pico (Heraeus).
- Microondas Samsung M63 (Samsung, Seúl, Corea del Sur).
- Micropipeta automática 10-200 µl LVWR International.
- Micropipeta muticanal Finnpiptette (Thermo Electron Corporation).
- Namodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).
- PCR –real Time Roche LightCycler 480 (LC 480).
- Sistema de agua Milli-Q gradient (Multipore, Massachusetts, Estados Unidos).
- Secuenciador automático 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem-Hitachi).
- Termobloque Eppendorf Termomixer Compact (Eppendorf).
- Termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems).
- Timer CMX3 (VWR, Pensilvania, Estados Unidos).
- Vortex (VWR).

2.2. Material fungible.

- Agarosa (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos).
- Agua destilada libre de nucleasas (Promega).
- Agua Milli-Q (Millipore).
- AmpliTaq DNA polimerase (Roche, Basilea, Suiza).
- Azul de bromoferol (Sigma-Aldrich).
- Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich).
- Cebadores para PCR (Biomol).
- Etanol absoluto (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Enzimas Bbv I y Mse I (New England BioLabs Inc.).
- Enzima Mae III (Roche).
- Gene Amp 10X PCR Buffer II & MgCl₂ solution (Roche).

- Guantes de latex Nursia (Palex Medical SA., Barcelona, España).
- Kit extracción de ADN EZ1® DNA Blood 350 µl kit (48) (QIAGEN).
- Kits LABType™ SSO Class I B Locus Typing Test (One Lambda).
- Kits LABType™ SSO Class II DRB1 Typing Test (One Lambda).
- Matrices (VWR).
- Marcador de peso molecular Nº V (Boehringer Mannheim, grupo Roche).
- PE-Conjugated Streptavidin (LT-SAPE) (One Lambda).
- Pipetas Pasteur (VWR).
- Probetas (VWR).
- Puntas de micropipeta ART (Molecular Bioproducts, Grupo Thermo Fisher Scientific).
- Sacarosa (Sigma-Aldrich).
- Set de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (Roche).
- TaqMan GTX Master Mix (2X) (Applied Biosystems).
- TaqMan GTX Genotyping Assay (20X).
- TBE 10X (Sigma-Aldrich).
- Tubos 1,5 ml (Eppendorf).
- Tubos 200 µl (Eppendorf).

2.3. Soluciones.

- Solución de bromuro de etidio:
0,2 g de bromuro de etidio.
20 ml de agua destilada.
Agitar bien y mantener a 4°C en oscuridad.
- Solución de etanol al 70%:
70 ml de etanol absoluto.
30 ml de agua destilada.
- Tampón de carga:
0,25 g de azul de bromofenol.
40 g de sacarosa.
100 ml de agua destilada.
Agitar bien y conservar a 4°C.
- TBE IX:
50 ml de TBE 10X.
450 ml de agua destilada.

2.4. Softwares y programas específicos.

- Luminex 100 IS Software.

- HLA Fusion 330 Software.
- Genemapper Software versión 4.0.
- R-Project versión 3.2.2.

3. Métodos.

3.1. Obtención y almacenamiento de las muestras de sangre periférica.

De cada paciente se recogieron 15 ml de sangre en 3 tubos de 5 ml cada uno con anticoagulante (citrato). Se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, a fin de separar la capa de leucocitos (“buffy coat”) del resto de componentes sanguíneos. La capa de leucocitos de uno de los tubos se empleó para la extracción de ADN, mientras que las otras dos se aislaron y se almacenaron a -80°C en tubos de 1,5 ml convenientemente rotulados e identificados.

3.2. Extracción del ADN.

El ADN de cada paciente se extrajo a partir del “buffy coat” en el Bio Robot EZ1, utilizando el kit EZ1® DNA Blood 350 µl kit (48) (QIAGEN), según el protocolo descrito por el fabricante. Se partió de un volumen inicial de muestra de 350 µl y se programó un volumen de elución de 200 µl en todos los casos.

3.3. Cuantificación del ADN.

La cuantificación de los ácidos nucleicos obtenidos se realizó a partir de 1 µl de muestra en el equipo Nanodrop 1000 Spectrophotometer, siguiendo las instrucciones del fabricante. El “blanco” se realizó con agua destilada.

3.4. Preparación de las muestras de ADN.

A partir de cada una de las muestras madre de ADN, una vez reconocida su concentración, se prepararon diluciones de trabajo de 100 ng/µl. Los volúmenes de agua destilada y de ADN de la muestra madre que había que añadir en cada caso se calcularon mediante la fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Donde C representa concentración, V volumen y los subíndices i y f indican “inicial” y “final” respectivamente.

Las diluciones de trabajo a 100 ng/μl se conservaron a 4°C y las muestras madre se conservaron en una genoteca a -80°C.

3.5. Determinación de las variantes alélicas de los genes HLA de clase I (HLA-B*) y clase II (HLA-DRB*).

La determinación de los alelos clase I y II se llevó a cabo mediante la técnica PCR-SSO (polymerase chain reaction, sequence specific oligonucleotide), utilizando para ello el kit comercial LABType SSO Typing (One Lambda) específico para cada locus. Esta tecnología utiliza sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) unidas a microesferas cifradas de forma fluorescente para identificar alelos codificados mediante el ADN de muestra.

LABType aplica la tecnología Luminex para el método de tipificación inversa de ADN de SSO. Primero, el ADN de destino se amplifica por PCR utilizando un cebador específico de grupo. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE).

El producto de PCR se desnaturaliza y se vuelve a hibridar con sondas de ADN complementarias conjugadas con microesferas cifradas de forma fluorescente. Un analizador de flujo, LABScan TM 100, identifica la intensidad de fluorescencia de la ficoeritrina en cada microesfera. La asignación de la tipificación de HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas.

Los componentes del sistema son los siguientes:

- Mezcla optimizada previamente y probada de microesferas con sondas unidas de forma covalente.
- Tampones de reacción de hibridación para facilitar la unión del ADN de destino a la sonda.
- Tampón de lavado para quitar el ADN no unido.
- Tampón con SAPE para diluir la solución de SAPE de reserva.
- Reactivos de amplificación de ADN (mezcla de cebador específico de loci optimizado previamente para HLA).
- D-mix (amplificación formulada especialmente).

La cantidad de cebadores y las concentraciones de los reactivos del kit están ajustadas para una amplificación óptima de muestra de ADN a una concentración de 20 μg/μl.

Los kits se almacenaron y conservaron congelados a -20°C hasta su uso, según las instrucciones descritas en el mismo. Una vez abiertos, se conservaron a 4°C en la nevera.

El protocolo resumido para el genotipaje de HLA por LABType SSO fue el siguiente:

Todas las preparaciones de PCR se realizaron en la zona de preamplificación, y en condiciones de esterilidad, para lo cual se utilizó una campana de flujo laminar.

3.5.1. Amplificación.

Se ajustó el ADN a $20\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ utilizando agua estéril y libre de DNAasas, y se mezcló el volumen D-mix y cebadores necesarios (Tabla 4). Acto seguido, se pipetearon $2\text{ }\mu\text{l}$ de ADN ajustado a cada pocillo de la placa de PCR y se añadieron $18\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla de amplificación (excepto la Taq polimerasa que se añadió al final) por cada muestra para un volumen total de $20\text{ }\mu\text{l}/\text{pocillo}$. La PCR se realizó según las condiciones de la tabla 5.

TABLA 4: Mezcla de amplificación para PCR para ensayo LABType PCR- SSO.

Nº reacciones	D-Mix (μl)	Cebadores amplificación (μl)	Taq polimerasa (μl)
1	13,8	4	0,2
10	138	40	2
50	690	200	10
96	1491	432	21,6

TABLA 5: Condiciones de PCR para el ensayo LABType PCR-SSO.

Pasos	Temperatura y tiempo de incubación	Nº de Ciclos
Paso 1	96°C, 3 min	1
Paso 2	96°C, 20 seg 60°C, 20 seg 72°C, 20 seg	5
Paso 3	96°C, 10 seg 60°C, 15 seg 72°C, 20 seg	30
Paso 4	72°C, 10 min	1
Paso 5	4°C, ilimitado	1

3.5.2. Desnaturalización.

Tras la amplificación, se extrajo la placa de PCR del termociclador y se transfirieron 5 µl de cada pocillo a una nueva placa de PCR. Se añadieron 2,5 µl de tampón de desnaturalización más 5 µl de tampón de neutralización y se mezcló. Previo al tercer paso se mantuvo la placa de PCR en hielo.

3.5.3. Hibridación.

El termociclador se programó a 60 °C para calentar el bloque térmico previo a su uso y se preparó la mezcla de hibridación según la tabla. Se añadieron 38 µl de mezcla de hibridación a cada pocillo y se agitó la PCR en el vórtex a velocidad baja antes de colocarla en el termociclador a 60 °C durante 15 minutos. Tras la incubación se añadieron 100 µl de tampón de lavado a cada pocillo y se centrifugó la placa de PCR durante 5 minutos a 1000-1300 g. Esto se repitió hasta completar 3 lavados. Durante la tercera centrifugación se preparó la solución de SAPE 1X según la tabla 7.

TABLA 6: Preparación de la mezcla de hibridación.

Nº de pruebas	Tampón de desnaturalización (μl)	Tampón de neutralización (μl)	Tampón de hibridación (μl)	Tampón de lavado (μl)	Mezcla de microesferas (μl)
1	2,5	5	34	480	4

TABLA 7: Volúmenes de SAPE y tampón de SAPE.

Nº de pruebas	SAPE de reserva (μl)	Tampón con SAPE (μl)
1	0,5	49,5

3.5.4. Etiquetado.

En el último paso se añadió 50 μl de solución SAPE 1X a cada pocillo, y se agitó la placa de PCR en el vórtex a velocidad baja. Luego, se introdujo la placa de PCR en el termociclador precalentado a 60°C e incubó 15 minutos. Se añadieron 100 μl de tampón de lavado a cada pocillo y se centrifugó la placa de PCR 5 minutos a 1000-13000 g. El sobrenadante se decantó y se añadieron 70 μl de tampón de lavado a cada pocillo para con una pipeta multicanal transferir el contenido de la placa de PCR a una placa de lectura que se mantuvo a 4°C hasta su lectura en el analizador LABScan TM 100. La adquisición de muestras y datos con el LABScan TM 100 se realizó según las instrucciones del fabricante.

3.5.5. Adquisición.

La adquisición de muestras y datos con el LABScan TM 100 se realizó según las instrucciones del fabricante, mediante el software Luminex® 100 IS. El análisis de los datos brutos y la determinación de los tipajes se llevaron a cabo en el software HLA Fusion 330.

3.6. Alelos del microsatélite de la región transmembrana de MICA.

En este trabajo se ha incluido el estudio de un microsatélite polimórfico localizado en el exón 5 del gen MICA, el cual codifica la región transmembrana de la proteína. Los microsatélites son secuencias cortas de ADN (50-300 pb) compuestos de monómeros repetidos en tándem (1-6 pb). Este microsatélite en concreto consiste en un número variable de repeticiones GCT que dan lugar a cuatro, cinco, seis y nueve tripletes que se corresponden con los alelos llamados A4, A5, A6 y A9 respectivamente. El alelo A5.1 tiene una guanina insertada tras dos tripletes GCT. Esto tiene como resultado una mutación que causa un codón de parada en la región transmembrana que da lugar a una forma soluble de la proteína.

La determinación de los alelos de la región transmembrana de MICA se llevó a cabo por la técnica de análisis de microsatélites o análisis STR (short tandem repeats). Este método está basado en la técnica de PCR, con la particularidad de que los cebadores empleados para el análisis tienen moléculas fluorescentes unidas de forma covalente a uno de ellos. Tras la reacción de PCR, se añaden a la mezcla patrones de longitud de ADN internos y se separan los ADN según su tamaño en un aparato de electroforesis capilar, generalmente un secuenciador automático. Los picos de ADN se van detectando cuando migran por el gel, mediante activación por láser del fluorocromo unido al cebador. Los aparatos de secuenciación poseen una salida de datos digital, de modo que los datos pasan a un ordenador donde se pueden analizar mediante programas específicos.

El protocolo resumido para el genotipaje de MICA por STR fue el siguiente:

3.6.1. Preparación de la PCR.

Todas las mezclas de PCR se realizaron en la zona de preamplificación y en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

La secuencia de cebadores utilizada fue la siguiente:

MICA 5R: 5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3' ("Reverse").

MICA 5F: 5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3' ("Forwards").

Además, el cebador "Reverse" (MICA-5R) tenía unida una molécula del fluorocromo 6-FAM en el extremo 5'.

La amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 25 µl. Los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR se mezclaron manualmente teniendo en cuenta las siguientes condiciones para cada muestra:

TABLA 8: Mezcla de amplificación.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
MICA 5R (10 μM)	1	0,4 μM
MICA 5F (10 μM)	1	0,4 μM
dNTPs (10 mM)	0,5	0,2 mM
Mg Cl2 (25 mM)	1,5	1,5 mM
Tampón 10X	2,5	1X
Ampli Taq DNA polimerasa (5 u/μl)	0,2	1 u/25 μl
H2O dest.	16,3	
ADN (50 ng/ μl)	2	4 ng/μl
Volumen final	25	

La reacción de PCR tuvo lugar en tubos de PCR individuales de 200 μl que se colocaron en un termociclador previamente programado, como indica la siguiente tabla:

TABLA 9: Condiciones de PCR para el genotipaje de MICA por STR.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	94	120
30	94	60
	55	60
	73	30
1	72	420
1	4	Ilimitado

3.6.2. Análisis de microsatélites.

Para analizar el tamaño de los diferentes fragmentos obtenidos, los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis capilar en un secuenciador automático 3130 XL Genetic Analyzer. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Realizar una dilución 1:250 a los productos de PCR.
- Añadir 10 µl de marcador GS 500 ROX con formamida Hi-Di.
- Desnaturalizar las muestras a 95°C durante 3 minutos.
- Enfriar durante 3 minutos.
- Realizar la electroforesis capilar en el equipo.

Los diferentes tamaños de fragmentos se corresponden con los distintos alelos según la siguiente tabla:

TABLA 10: Relación alelo-tamaño (pb).

Alelo	Tamaño (pb)
A4	178
A5	182
A5.1	183
A6	185
A9	194

La asignación de los alelos se llevó a cabo con el software Genemapper versión 4.0:

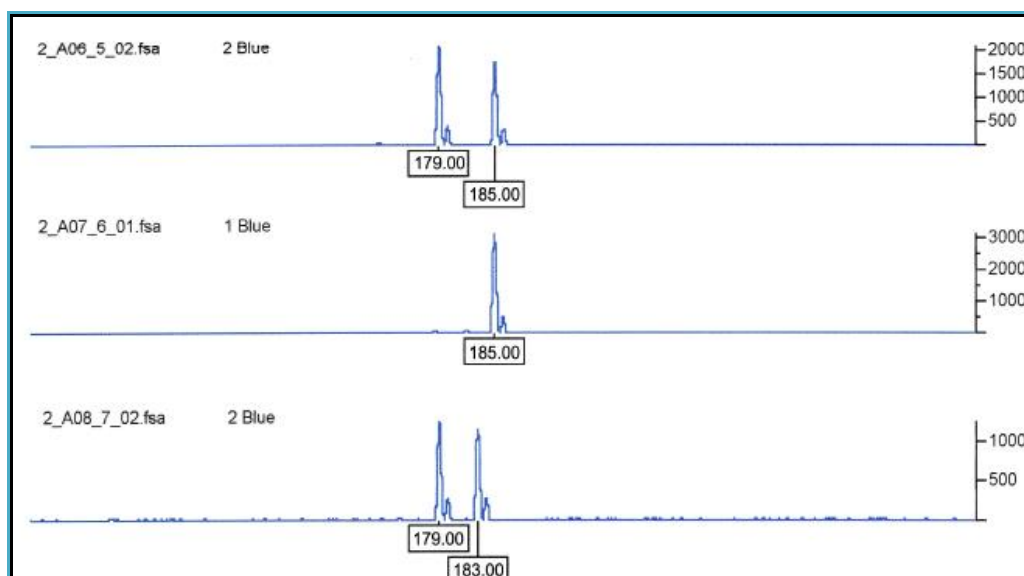


FIGURA 20: Patrón de picos obtenidos al tipar los alelos del exón 5 de MICA. En la imagen se encuentra el resultado de tres muestras, dos de ellas heterocigotas (se observan dos picos de fluorescencia que se corresponden con dos tamaños de fragmento distintos, y por tanto, con dos alelos) y una homocigota (un solo pico de fluorescencia). Según el patrón de picos obtenido para estos individuos, pueden deducirse los siguientes tipajes: muestra A06_5_02 →MICA-A4/A6; muestra A07_6_01 →MICA-A6/A6; muestra A08_7_02 →MICA-A4/A5.1.

3.7. Determinación de las variantes alélicas de los genes LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2.

En nuestro trabajo seleccionamos 7 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de estos genes, que han sido documentados en la literatura por su relación con el riesgo de cáncer.

TABLA 11: Selección de polimorfismos de los genes LMP/TAP.

Gen	Alelo	SNP	Sustitucion nucleótido	Posición aminoácido	Sustitución aminoácido
LMP2	LMP2	rs17587	CGC→TGC	60	Arg→Cys
LMP7	LMP7	rs2071543	CAG→AAG	145	Gln→Lys
TAP1	TAP1.1	rs1057141	ATC→GTC	333	Ile→Val
	TAP1.2	rs1135216	GAC→GGC	637	Asp→Gly
TAP2	TAP2.1	rs1800454	GTA→ATA	379	Val→Ile
	TAP2.2	rs241447	ACA→GCA	665	Thr→Ala
	TAP2.3	rs241448	TAG→CAG	687	Stop→Gln

La determinación de estos polimorfismos se realizó mediante la técnica de PCR *a tiempo real*. En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) *a tiempo real* es la técnica más sencilla para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR *a tiempo real* se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar ADN a partir de pequeñas cantidades, ampliándolas hasta más de un billón de veces (Mullis KB, 1990).

Es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10^7 equivalentes genómicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar un electroforesis posterior.

Para la amplificación por PCR *a tiempo real*, además de los reactivos, es necesario emplear un fluoróforo. Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR pueden ser de dos tipos:

- Fluoróforos con afinidad por el ADN.
- Sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento de ADN de interés (blanco).

Los equipos para llevar a cabo la PCR *a tiempo real* incluyen un termociclador y una unidad capaz de detectar señales fluorescentes (fluorómetro) para monitorear el progreso de la reacción de amplificación, así como un hardware y un software para la captura y el análisis de datos respectivamente.

El equipo usado en nuestro trabajo fue Roche Lightcycler 480 (LC 480) mediante sondas Single Probe. Permite trabajar en el formato de 384 pocillos. El protocolo resumido para el genotipaje de los polimorfismos de LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2 fue el siguiente:

3.7.1. Preparación de la PCR.

Todas las mezclas de PCR se realizaron en la zona de preamplificación y en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

Una vez estandarizadas las muestras de ADN a 25 ng/ μ l, se procedió a realizar las siguientes mezclas de reacción para el ensayo de amplificación para:

- Los polimorfismos LMP2 (rs17587), LMP7 (rs2071543), TAP1.1 (rs1057141), TAP1.2 (rs1135213), TAP2.1 (rs1800454) y TAP2.3 (rs241448):

TABLA 12: Mezcla de amplificación.

Reactivos	Placa de 384 pocillos x 1 Volumen (μl)
TaqMan GTX Master Mix (2X)	2,5
TaqMan Genotyping Assay (20X)	0,25
DNA molde	1
H2O libre de nucleasas	1,25
Volumen final	5

- El polimorfismo TAP2.2 (rs241447):

TABLA 13: Mezcla de amplificación.

Reactivos	Placa de 384 pocillos x 1 Volumen (μl)
TaqMax GTX Master Mix (2X)	0,25
TaqMax Genotyping Assay (20X)	
6. Primer F 10 μM	0,25
7. Primer R 10 μM	0,25
Sonda 1 (200 nM)	0,25
Sonda 2 (200 nM)	0,25
AND molde	1
H2O libre de nucleasas	0,5
Volumen final	5

Posteriormente se procedió a la realización de la PCR mediante el siguiente programa:

TABLA 14: Descripción del programa de amplificación.

Etapa	Nº ciclos	Modelo de análisis				
Pre-Incubación	1	Ninguno				
Amplificación	40	Cuantificación				
			Temperatura (°C)	Modelo de adquisición	Tiempo (seg)	Tasa de Aceleración (°C/seg)
			92	Ninguno	15	2,5
			60	Simple	60	2,5
			72	Ninguno	1	4,8
Enfriamiento	1	Ninguno				

3.7.2. Lectura de los resultados.

3.8. Determinación de la variante polimórfica del gen NKG2D.

En este trabajo se ha estudiado el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) de NKG2D Thr72Ala (A/G) (rs2255336), situado en la región que codifica la parte transmembrana de este receptor. Para ello se usó la técnica de PCR y posterior digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP). Se trata de una amplificación de una secuencia genética con restricción posterior del producto obtenido.

Las enzimas o endonucleasas de restricción reconocen una secuencia de nucleótidos determinada, dentro de una molécula de ADN y la cortan en un punto en concreto conocido como diana de restricción. El número de fragmentos que se obtienen es equivalente a las veces que se encuentra repetida la diana. El tamaño de los fragmentos, dependerá de la separación entre dos lugares de restricción continuos; y los cambios, ya sean por recombinación o mutación, conducirán a diferentes perfiles de restricción.

El protocolo resumido para el genotipaje de NKG2D Thr72Ala (A/G) por la técnica PCR-RFLP fue el siguiente:

3.8.1. Preparación de la PCR.

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

Todas las mezclas de PCR se realizaron en la zona de preamplificación y en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente:

NKG2D-F: 5'-GAGGTATTTATGTTCTGTTCTGG-3'.

NKG2D-R: 5'-TCTACTTCTCTGTTGTCACTTAC-3'.

La amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 25 μ l. Los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR se mezclaron manualmente teniendo en cuenta las siguientes condiciones para cada muestra:

TABLA 15: Mezcla de amplificación.

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración final
NKG2D-F (10 μM)	1	0,4 μ M
NKG2D-R (10 μM)	1	0,4 μ M
dNTPs (10 mM)	0,5	0,2 mM
Mg2+ (25 mM)	1,5	1,5 mM
Tampon 10X	2,5	1X
Ampli Taq (5 u/μl)	0,4	2 u
H2O dest.	16,1	
ADN (50 ng/μl)	2	4 ng/ μ l
Volumen final	25	

La reacción de PCR tuvo lugar en placas de PCR con 96 pocillos y de 200 μ l que se colocaron en un termociclador previamente programado según la siguiente tabla:

TABLA 16: Condiciones de PCR para el genotipaje de NKG2D Thr72Ala (A/G) por PCR-RFLP.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	10 min
	94	45 seg
40	56	45 seg
	72	50 seg
1	72	5 min
1	4	Ilimitado

Para testar la calidad de la amplificación, se comprobaron los productos de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 4% con bromuro de etidio. El proceso detallado del procedimiento se explica a continuación.

3.8.1.1. Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa puede tener diversas aplicaciones, siendo la separación de moléculas de ADN en función de su tamaño una de las más utilizadas. En determinados soportes, como el gel de agarosa, el medio (gel) ofrece una resistencia notable al avance de las moléculas cuando éstas se someten a un campo eléctrico, por lo que la movilidad depende mucho del tamaño de la molécula.

La agarosa es un polisacárido cuyas disoluciones poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de aproximadamente 50°C y formar un gel semisólido al enfriarse. Este ge está constituido por una matriz tridimensional de fibras poliméricas embebida en una gran cantidad de medio líquido que retarda el paso de las moléculas del ácido nucleico. La velocidad a la que migran las moléculas depende de dos factores: el tamaño de la molécula y el diámetro de los poros de la matriz, que a su vez depende directamente de la concentración a la que se encuentre la agarosa, siendo mayor el tamaño del poro a menores concentraciones del polisacárido.

- Preparación del gel:

Se fabricaron geles de agarosa al 4% siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Añadir la cantidad de agarosa apropiada al TBE 1X.

2. Mover y calentar en el microondas a potencia media (90-100°C) durante aproximadamente 2 minutos. Asegurarse de que no queden grumos.
 3. Enfriar hasta 50°C, moviéndolo para evitar que gelifique.
 4. Añadir el volumen de bromuro de etidio necesario para que alcance en el gel una concentración final de 0,5 µg/ml y mezclarlo muy bien. El bromuro de etidio es un fluorocromo que se intercala en la doble hélice de ADN, lo que nos permitirá visualizar las bandas iluminando el gel con luz ultravioleta.
 5. Verter cuidadosamente la mezcla en el portageles para evitar la formación de burbujas, colocar los pines y dejar gelificar (a 37°C unos minutos). La gelificación debe tener lugar sobre una superficie nivelada para que el gel tenga un grosor uniforme.
- Electroforesis:

Cuando el gel solidificó, se retiraron con cuidado los peines, se introdujo con el portageles en la cubeta de electroforesis y se cubrió con la cantidad suficiente de TBE 1X. Posteriormente se pipeteó un volumen de 5 µl del producto de PCR en tubos estériles de 1,5 ml y se añadió 2 µl de tampón de carga en cada muestra. Se cargaron las muestras en los pocillos de gel (a partir del segundo pocillo) de manera consecutiva, mientras que el primer pocillo se añadió 1 µl del marcador de peso molecular (Molecular Weight Marker V, Roche) junto con 1 µl de tampón de carga.

A continuación, se conectó el sistema a la electricidad, comprobando previamente que los pocillos se encontraban en el extremo del gel más cercano al cátodo. La electroforesis se realizó a 100 voltios (V) durante un tiempo de 30 minutos. Tras finalizar la carrera se visualizaron las bandas iluminándolas con luz ultravioleta en el equipo de imagen.

3.8.2. Digestión enzimática.

La digestión de los productos de PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25 µl. Se llevó a cabo con la enzima Mae III con la que se obtenían dos fragmentos de 217 pb y 54 pb para el alelo A (72 Thr; ACA) y un fragmento de 271 pb para el alelo G (72 Ala; GCA), teniendo en cuenta las siguientes condiciones para cada muestra:

TABLA 17: Condiciones para la digestión enzimática.

Reactivo	Volumen
Enzima Mae III	1 µl
ADN (producto PCR)	1 µg
Incubación Buffer	12,5 µl (2X)
H2O	Variable
Volumen final	25 µl

Temperatura de incubación: 55°C

Tiempo de incubación: 1 h

3.8.3. Lectura.

Los fragmentos obtenidos tras el tratamiento con la endonucleasa fueron separados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 4% (procedimiento detallado anteriormente). Para ello, las muestras y patrones mezclados con el tampón de carga se depositaron en los pocillos con ayuda de una pipeta (25 µl del producto de la digestión enzimática más 5 µl del tampón de carga). Igualmente se colocó en el primer pocillo 1 µl del marcador de peso molecular (Molecular Weight Marker V, Roche) junto con 1 µl del tampón de carga. Se realizó la electroforesis a 100 V durante 30 minutos. Una vez concluida, se colocó el gel en el equipo de imagen y se iluminó con luz ultravioleta (UV), capturando digitalmente una imagen de los resultados.

3.9. Determinación de las variantes polimórficas del gen CTLA-4.

En nuestro trabajo se han analizado dos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de CTLA-4. El primero de ellos es el polimorfismo +49 A/G, denominado así porque se trata de un cambio (adenina-guanina) en la posición del nucleótido 49 en el exón 1 del gen CTLA-4, que da lugar a un cambio de aminoácido, de alanina a treonina. El segundo de ellos es el -1661 A/G localizado en la región del promotor del gen.

Para ello se usó la técnica PCR-RFLP, utilizada y descrita anteriormente para la determinación de la variante polimórfica de NKG2D.

El protocolo resumido para el genotipaje de los polimorfismos de CTLA-4 +49 G/A y -1661 A/G por la técnica PCR-RFLP fue el siguiente:

3.9.1. Preparación de la PCR.

Todas las mezclas de PCR se realizaron en la zona de preamplificación y en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

La secuencia de cebadores fue la siguiente:

- CTLA-4 +49 G/A (rs231775):

CTLA-4- +49 G/A F: 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'.

CTLA-4- +49 G/A R: 5'-GCTCTACCTCTTGAAGACCT-3'.

- CTLA-4 -1661 G/A (rs4553808):

CTLA-4 -1661 F: 5'-CTAAGAGCATCCGCTGCACCT-3'.

CTLA-4 -1661 R: 5'-TTGGTGTGATGCACAGAAGCCTTTT-3'.

La amplificación se realizó en un volume final de 25 µl. Los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR se mezclaron manualmente teniendo en cuenta las siguientes condiciones para cada muestra:

- CTLA-4 +49 G/A:

TABLA 18: Mezcla de amplificación.

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
CTLA-4 F (10 µM)	1	0,4 µM
CTLA-4 R (10 µM)	1	0,4 µM
dNTPs (10 mM)	0,5	0,2 mM
Mg2+ (25 mM)	0,3	0,3 mM
Tampon 10X	2,5	1X
Ampli Taq (5 u/µl)	0,4	2 u
H2O dest.	17,3	
ADN (50 ng/µl)	2	4 ng/µl
Volunen final	25	

- CTLA-4 -1661 G/A:

TABLA 19: Mezcla de amplificación.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
CTLA-4 -1661 F (10 μM)	1	0,4 μM
CTLA-4 -1661 R (10 μM)	1	0,4 μM
dNTPs (10 mM)	0,5	0,2 mM
Mg2+ (25 mM)	1,5	1,5 mM
Tampon 10X	2,5	1X
Ampli Taq (5 u/μl)	0,4	2 u
H2O dest.	16,1	
ADN (50 ng/ μl)	2	4 ng/μl
Volumen final	25	

La reacción de PCR tuvo lugar en tubos de PCR de 200 μl que se colocaron en un termociclador previmante programado según el siguiente procedimiento:

- CTLA-4 +49 G/A:

TABLA 20: Condiciones de PCR para el genotipaje de CTLA-4 +49 G/A por PCR-FRLP.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4 min
	94	30 seg
30	56,4	10 seg
	72	30 seg
1	72	4 min
1	4	Ilimitado

- CTLA-4 -1661 G/A:

TABLA 21: Condiciones de PCR para el genotipaje de CTLA-4 -1661 G/A por PCR-RFLP.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5 min
	94	15 seg
30	58	30 seg
	72	45 seg
1	72	7 seg
1	4	Ilimitado

3.9.2. Digestión enzimática.

La digestión de los productos de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl. Para el polimorfismo CTLA-4 +49 G/A se llevó a cabo con la enzima Bbv I con la que se obtenían dos fragmentos de 255 pb y 56 pb para el alelo G y un fragmento de 311 pb para el alelo A. Mientras que para el polimorfismo CTLA-4 -1661 G/A se utilizó la enzima Mse I, la que se obtenían dos fragmentos de 333 pb y 153 pb para el alelo A y un fragmento de 486 pb para el alelo G. Las condiciones para cada polimorfismo se detallan a continuación:

- CTLA-4 +49 G/A:

TABLA 22: Condiciones para la digestión enzimática.

Reactivo	Volumen
Enzima Bbv I	1 µl
ADN (producto PCR)	1 µg
NE Buffer 10X	5 µl (1X)
Volumen final	50 l

Temperatura de incubación: 37°C

Tiempo de incubación: 5-15 min

- CTLA-4 -1661 G/A:

TABLA 23: Condiciones para la digestión enzimática.

Reativo	Volumen
Enzima Mse I	1 µl
ADN (producto PCR)	1 µg
NE Buffer 10X	5 µl (1X)
Volumen final	25 l

Temperatura de incubación: 37°C

Tiempo de incubación: 5-15 min

3.9.3. Lectura.

Los fragmentos obtenidos tras el tratamiento con la endonucleasa fueron separados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 4 %. Las muestras y patrones mezclados con el tampón de carga se depositaron en los pocillos con ayuda de una pipeta (25 µl del producto de la digestión enzimática más 5 µl del tampón de carga), colocando en el primer pocillo 1 µl del marcador de peso molecular (Molecular Weight Marker V, Roche) junto con 1 µl del tampón de carga. Se realizó la electroforesis a 100 V durante un tiempo de 30 minutos. Una vez concluida la electroforesis se procedió a la visualización de las bandas y captura digital de imágenes.

4. Análisis estadístico de los resultados.

“Los análisis estadísticos han sido realizados por la Unidad de Asesoramiento Metodológico y Estadístico de IBIMA_FIMABIS. El software utilizado fue R versión 3.2.2. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; available at <http://www.R-project.org>)”.

Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de las variables del estudio. Los valores de las variables continuas se resumieron en una tabla donde se mostraron sus correspondientes medias, desviación estándar o medianas según la distribución de la variable fuese o no simétrica, rango de valores: máximo o mínimo. Las variables categóricas se presentaron en frecuencias absolutas y frecuencias relativas.

Para analizar si las diferencias observadas en las frecuencias de las variables de interés son estadísticamente significativas, en el caso de variables cualitativas se evaluó mediante el test de la Chi-cuadrado o a través de la prueba exacta de Fisher en el caso de que el porcentaje de valores esperados menor de 5 superase el 20%. Se calculó la razón de ventaja (odd ratio) y sus correspondientes intervalos de confianza al 95% para el caso de tablas bidimensionales.

Para analizar las frecuencias entre variables cuantitativas continuas en dos grupos independientes se aplicó la prueba de T de Student para dos muestras independientes en el caso donde se aceptaba la condición de normalidad de las variables en cada uno de los grupos, lo cual se comprobaba mediante el test de Shapiro-Wilk. En el caso donde no se aceptaba la normalidad, se aplicaba la correspondiente prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Con respecto al análisis de genotipos para determinar si cada polimorfismo de nucleótido simples (SNP) estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg, una prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates se realizó mediante la SNPAssoc (librería para el análisis de datos genéticos de R). Las frecuencias de alelos y genotipos entre los pacientes con cáncer y sujetos control se analizaron mediante regresión logística. Se calcularon odd ratio (OR) con un intervalo de confianza al 95%. Un valor de p inferior al 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Por último, realizamos un análisis cluster de determinadas variables clínicas de pacientes con cáncer de mama (CM) y los polimorfismos genéticos estudiados. El análisis de cluster es un conjunto de técnicas multivariantes utilizadas para clasificar a un conjunto de individuos en grupos homogéneos. La principal diferencia respecto a otras técnicas que también tienen por objetivo la clasificación de individuos (como el análisis discriminante) es que los grupos son desconocidos a priori y, de hecho, lo que habitualmente se requiere es conocer los grupos de individuos y las variables que permiten discriminar entre los diferentes grupos.

El objetivo es por tanto, obtener grupos de individuos lo más parecidos posible entre sí y los más diferente posible a los individuos del resto de los grupos. Es importante establecer el criterio de homogeneidad entre los individuos es un grupo ya que determina claramente el algoritmo de clustering a utilizar. Existen múltiples medidas de homogeneidad y algoritmos de clustering, y depende en gran medida de la experiencia del analista decidir qué medida y método son los más adecuados en función de la naturaleza de los datos disponibles y de los objetivos del estudio.

En el ámbito biomédico se han utilizado tradicionalmente métodos como el clustering jerárquico junto con la visualización del heatmap (Eisen M et al., 1998), el algoritmo de las K-medias (Tohill R et al., 2008) o los mapas auto-organizados (SOM) (Nikkilä J et al., 2002) para encontrar grupos de genes o pacientes con relevancia biológica. Estos métodos, sin embargo, presentan restricciones en cuanto a la extracción de toda la información almacenada en los datos, dado que en primer lugar realizan agrupamientos de genes y posteriormente de pacientes (o viceversa). Así, puede ocurrir que grupos de genes co-expresados sólo en un subconjunto determinado de muestras permanezcan ocultos y sin ser detectados por el algoritmo. En este sentido, los métodos de biclustering publicados recientemente en la literatura han proporcionado resultados satisfactorios en diferentes problemas de naturaleza biomédica. Concretamente, Wang YK et al. usa un algoritmo de biclustering (CMonkey) para agrupar muestras de tumores de mama de 437 individuos basándose en la expresión de un

perfil específico de genes. Estos autores afirman que es posible identificar conjuntos de genes co-expresados en subgrupos de muestras de cáncer de mama usando métodos de biclustering.

El análisis biclustering (también conocido como co-clustering) es una técnica de análisis clustering que permite realizar de forma simultánea agrupamiento por filas y columnas de una matriz. El objetivo del biclustering es encontrar subgrupos de filas y columnas (pacientes y genes en nuestro caso) lo más similares posibles entre ellos y los más diferentes posible del resto. Es decir, esta familia de algoritmos permitiría encontrar subconjuntos de genes con un comportamiento similar (perfil de expresión) en determinados subconjuntos de condiciones experimentales o pacientes.

En este trabajo se han utilizado los paquetes biclust (Kaiser S et al., 2015), cluster (Maechler M et al., 2015) y blockcluster (Serge Iovleff and Parmeet Singh Bhatia, 2015) del entorno de programación R.

IV. RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de las variables clínicas en pacientes.	85
2. Análisis descriptivo y comparativo de las variables moleculares en pacientes y controles.	92
2.1. Distribución de los alelos de HLA clase I (HLA-B*) y clase II (HLA-DRB*).	92
2.2. Distribución de los alelos del exón 5 de MICA.	95
2.3. Distribución de las variantes alélicas de LMP2 y LMP7.	96
2.4. Distribución de las variantes alélicas de TAP1 y TAP2.	99
2.5. Distribución de los alelos de NKG2D.	107
2.6. Distribución de las variantes alélicas de CTLA-4.	109
3. Análisis comparativo de los haplotipos LMP7/TAP 2.1 entre pacientes y controles.	113
4. Análisis multivariante de los polimorfismos genéticos entre pacientes y controles.	114
5. Análisis comparativo de los diferentes polimorfismos genéticos en paciente en función de las variables clínicas de la enfermedad.	114
6. Análisis de parámetros de eficacia de tratamiento en función de los polimorfismos genéticos analizados.	130
7. Análisis biclustering de variables clínicas en pacientes con cáncer de mama y polimorfismos genéticos.	131

1. Análisis descriptivo de las variables clínicas en pacientes.

Se analizaron un total de 200 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en la provincia de Málaga, entre Diciembre del 2008 y Febrero del 2013, con un seguimiento máximo de 5 años. El punto de corte para el análisis de datos fue con fecha de 13 de Julio del 2015.

La edad media al diagnóstico de cáncer de mama fue de 52,54 años. De las 200 pacientes, 84 eran premenopáusicas (42%) en el momento del diagnóstico de la enfermedad, 68 de ellas tenían antecedentes familiares¹ de dicha enfermedad (34%) y en 11, la enfermedad debutó con afectación bilateral² (5,5%) al diagnóstico.

El subtipo histológico más frecuente encontrado fue el carcinoma ductal infiltrante en 180 pacientes (90%), mientras que la variante lobulillar representó solo un 5,5% del total (11 pacientes). La mayoría de los tumores eran de grado histológico II y III (41,5% para cada uno de ellos), y hasta un 78,5% de ellos expresaban receptores hormonales para estrógenos y/o progesterona. Dentro de la clasificación por subtipos moleculares, el más frecuente fue el Luminal B/Her negativo, estando presente en 80 pacientes (40,2% de la muestra), seguido del Luminal A (60 pacientes, 30,1%), Luminal B/ Her2 positivo (25 pacientes, 12,6%), triple negativo (18 pacientes, 9,1%) y por último el subtipo Her2 positivo puro (16 pacientes, 8%).

En cuanto al estadiaje³ de la enfermedad, del total de 200 pacientes, 10 de ellas eran estadio IV al diagnóstico (10%). La mayoría de las pacientes fueron diagnosticadas en estadios iniciales de la enfermedad (25,9% en estadio IA y 32,5% en estadio IIA).

Con respecto al tratamiento efectuado, en 197 pacientes se realizó cirugía de la mama (en 3 pacientes, estadios IV al diagnóstico, no se contempló la opción quirúrgica como tratamiento). La técnica que se realizó con más frecuencia fue la cirugía conservadora de la mama más ganglio centinela en 79 pacientes (39,5%), seguida de mastectomía más linfadenectomía en 58 pacientes (29%). En un 82% de las pacientes se administró tratamiento complementario con quimioterapia, siendo el esquema más usado la quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos (44,5%). Un total de 155 pacientes (77,5%) recibieron tratamiento hormonal, siendo el fármaco más usado el tamoxifeno en 84 pacientes (42%), seguido de los inhibidores de aromatasas (27%). El 81% de las pacientes recibió tratamiento local con radioterapia.

Respecto al seguimiento, sólo un grupo de 57 pacientes completó un total de 5 años desde el diagnóstico de la enfermedad hasta que se realizó el punto de corte de cierre de la base de datos. En este periodo, un total de 14 paciente fallecieron (3 de ellas de causa no relacionada con la enfermedad neoplásica), siendo la mediana de supervivencia global (SG) para este grupo de pacientes de 572 días (IC 95%: 538-1714) (Figura 21). A lo largo de todo el seguimiento, 20 pacientes recayeron de su enfermedad, con una mediana de supervivencia

libre de enfermedad (SLE) de 17621 días (IC 95%: 16423-19188) (Figura 23). A los tres años de seguimiento el 94% de las pacientes permanecían vivas (Figura 22).

1. Se incluyeron antecedentes familiares de cáncer de mama de primero y/o segundo grado, además de aquellos casos donde se cumplían criterios clínicos para síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.
2. En el caso de afectación bilateral del cáncer de mama en el momento del diagnóstico, la estadificación de la enfermedad se realizó teniendo en cuenta el tumor más grande, al igual como se determina en la práctica clínica habitual.
3. Se refiere al estadiaje posquirúrgico, salvo para 3 pacientes con estadio IV, donde no se realizó cirugía, y el estadiaje de la enfermedad fue clínico. Se utilizó la 7ª edición del manual de la AJCC para cáncer de mama, 2010.

Las siguientes tablas y figuras muestran un resumen del análisis descriptivo de las variables clínicas en el grupo de pacientes:

TABLA 24: Edad al diagnóstico en cáncer de mama.

Edad (años)	n	%
<45	59	29,5
45-54	62	31
55-64	42	21
>64	37	18,5
Total	200	100

TABLA 25: Estado hormonal al diagnóstico.

Estado hormonal	n	%
Premenopáusica	84	42
Perimenopáusica	18	9
Posmenopáusica	98	49
Total	200	100

TABLA 26: Antecedentes familiares (AF).

AF	n	%
Sí	68	34
No	132	66
Total	200	100

TABLA 27: Enfermedad bilateral (EB).

EB	n	%
Sí	11	5,5
No	189	94,5
Total	200	100

TABLA 28: Características de la enfermedad.

	n	%
Tipo histológico:		
- In situ	3	1,5
- Ductal infiltrante	180	90
- Lobulillar infiltrante	11	5,5
- Mixto: ductal y lobulillar	6	3
Grado histológico:		
- GH-I	30	15
- GH-II	83	41,5
- GH-III	83	41,5
- No conocido	4	2
Expresión hormonal:		
- Sí	157	78,5
- No	43	21,5
Subtipo molecular:		
- Luminal A	60	30,1
- Luminal B/Her2-	80	40,2
- Luminal B/Her2+	25	12,6
- Her2+	16	8
- Triple negativo	18	9,1

TABLA 29: Distribución por estadios (posquirúrgicos) de cáncer de mama (* existen 3 pacientes más, no intervenidas con cirugía, donde el diagnóstico se hizo de forma clínica).

Estadio	n	%
IA	51	25,9
IB	0	0
IIA	64	32,5
IIB	34	17,3
IIIA	23	11,7
IIIB	4	2
IIIC	9	4,6
IV	7	3,5
Total	197*	100

TABLA 30: Tratamiento realizado.

	n	%
Cirugía		
- No cirugía	3	1,5
- Cirugía conservadora + GC	79	39,5
- Cirugía conservadora + LA	42	21
- Mastectomía + GC	18	9
- Mastectomía + LA	58	29
Hormonoterapia		
- No administrada	45	22,5
- Tamoxifeno	84	42
- Inhibidor aromataza	54	27
- Secuencial: Tam-IA	16	8
- Secuencial: IA-Tam	1	0,5
Radioterapia		
- Sí	162	81
- No	38	19

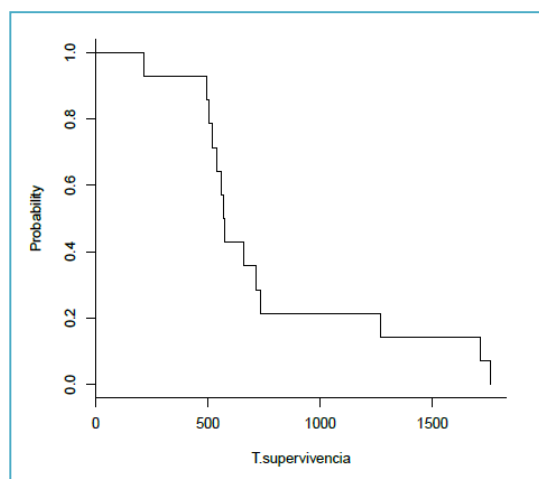


FIGURA 21: Supervivencia global (SG) para el subgrupo de pacientes fallecidas.

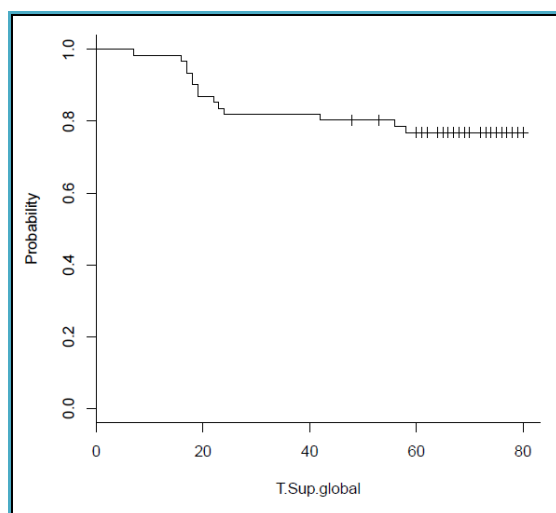


FIGURA 22: Supervivencia global (SG) para el grupo total de pacientes.

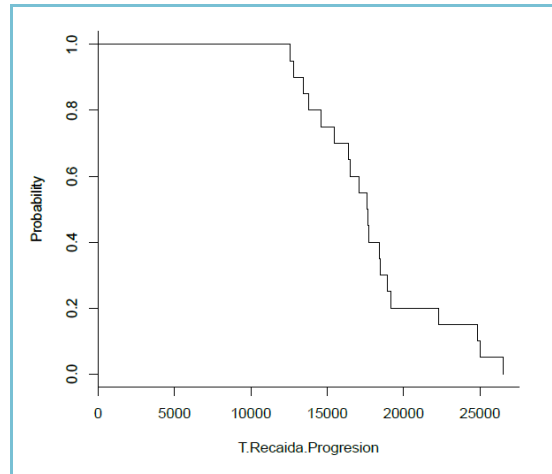


FIGURA 23: Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

2. Análisis descriptivo y comparativo de las variables moleculares en pacientes y controles.

2.1. Distribución de los alelos de HLA clase I (HLA-B*) y clase II (HLA-DRB1*).

2.1.1. Distribución de los alelos HLA de clase I HLA-B*.

Se realizó el genotipado del locus HLA-B* en un total de 200 pacientes de cáncer de mama y 169 controles sanos. Tal como se muestra en la tabla 31, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en la distribución de las frecuencias de las variantes alélicas del locus HLA-B, salvo para tres de ellas; HLA-B15, que se halló incrementada en pacientes respecto a controles de forma estadísticamente significativa, siendo $p=0,013$; HLA-B35 y HLA-B38, que se encontraron incrementadas en controles respecto a pacientes, también de manera significativa, siendo las $p=0,022$ y $p=0,028$ respectivamente. Sin embargo, cuando se realizó la corrección por el número de alelos (test de Bonferroni), se perdió la significación estadística en los tres casos.

TABLA 31: Comparación de la distribución de los alelos del locus HLA-B* de clase I en pacientes y controles.

HLA-B*	Pacientes		Controles		P	Pc
	2n= 400	(%)	2n= 338	(%)		
07	32	8	25	7,7	NS	-
08	21	5,2	18	5,6	NS	-
13	5	1,2	7	2,2	NS	-
14	26	6,5	20	6,2	NS	-
15	30	7,5	10	3,1	0,013	0,364
18	43	10,8	25	7,7	NS	-
27	11	2,8	6	1,9	NS	-
35	38	9,5	49	15,1	0,022	0,616
37	4	1	1	0,3	NS	-
38	9	2,2	18	5,6	0,028	0,784
39	2	0,5	3	0,9	NS	-
40	18	4,5	7	2,2	NS	-
41	6	1,5	7	2,2	NS	-
42	1	0,2	0	0	NS	-
44	60	15	51	15,7	NS	-
45	12	3	4	1,2	NS	-
47	2	0,5	0	0	NS	-
49	10	2,5	7	2,2	NS	-
50	6	1,5	8	2,5	NS	-
51	30	7,5	35	10,8	NS	-
52	8	2	8	2,5	NS	-
53	7	1,8	1	0,3	NS	-

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

55	5	1,2	1	0,3	NS	-
56	1	0,2	1	0,3	NS	-
57	8	2	8	2,5	NS	-
58	4	1	3	0,9	NS	-
67	1	0,2	0	0	NS	-
78	0	0	1	0,3	NS	-

2.1.2. Distribución de los alelos HLA de clase II HLA-DRB1*.

Se analizó el locus HLA-DRB1 en un total de 200 pacientes de cáncer de mama y 169 controles sanos. Como puede observarse en la siguiente tabla, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en la distribución de las frecuencias de las variantes alélicas del loci estudiado.

TABLA 32: Comparación de las frecuencias de los alelos del locus HLA-DRB1 de clase II en pacientes y controles.

HLA-DRB1	Pacientes		Controles		P
	2n= 400	(%)	2n= 338	(%)	
01	45	11,2	38	11,4	NS
03	44	11	44	13,2	NS
04	42	10,5	43	12,9	NS
06	1	0,2	0	0	NS
08	8	2	5	1,5	NS
09	1	0,2	1	0,3	NS
10	17	4,2	7	2,1	NS
11	56	14	31	9,3	NS
12	1	0,2	2	0,6	NS
13	53	13,2	58	17,4	NS
14	13	3,2	8	2,4	NS
15	43	10,8	37	11,1	NS
16	12	3	11	3,3	NS

2.2. Distribución de los alelos del exón 5 de MICA.

Se tipó un STR (Short Tandem Repeat) localizado en la región transmembrana del gen MICA (exón 5) en un total de 168 pacientes de cáncer de mama y 125 controles sanos.

No se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles en ninguno de los alelos estudiados (Tabla 33).

TABLA 33: Frecuencias alélicas del microsatélite del exón 5 de MICA en pacientes y controles.

Alelos	Pacientes		Controles		P
	2n= 336	(%)	2n= 251	(%)	
A4	29	8,6	20	8	0,880
A5	37	11	23	9,2	0,494
A5.1	93	27,7	75	29,9	0,580
A6	136	40,5	88	35,1	0,198
A9	41	12,2	45	17,9	0,059

2.3. Distribución de las variantes alélicas de LMP2 y LMP7.

2.3.1. Distribución de las variantes alélicas de LMP2.

Se genotipó el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) del gen LMP2 (rs17587) en 200 pacientes con cáncer de mama y 169 controles sanos. La siguiente tabla muestra la distribución de las frecuencias de genotipos y alelos para este polimorfismo en pacientes y controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las frecuencias de genotipos y alelos entre los dos grupos.

TABLA 34: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos del polimorfismo de LMP2 en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		P
		n= 200	(%)	n= 169	(%)	
LMP2 (rs17587)	CC	109	54,5	92	54,43	0,990
	CT	75	37,5	71	42,01	0,377
CGC→TGC (Arg-Cys)	TT	16	8	6	3,55	0,065
	C	293	73,25	255	75,44	
	T	107	26,75	83	24,55	
	HWE	0,587		0,098		

Para el análisis de este polimorfismo se usaron 5 modelos genéticos (codominante, dominante, recesivo, sobre-dominante y aditivo). La significación estadística en cualquier modelo se consideró como una posible asociación del polimorfismo con la susceptibilidad de padecer cáncer de mama. Por lo tanto, no hubo asociación significativa entre el polimorfismo LMP2 (rs17587) y el riesgo de cáncer de mama, para cada uno de los modelos (Tabla 35).

TABLA 35: Asociación entre el polimorfismo de LMP2 y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	P	AIC
LMP2 (rs17587)	n=200 (%)		n=169 (%)					
Codominante:								
- CC	109	54,5	92	54,4	1		0,160	511,3
- CT	75	37,5	71	42	1,12	0,73-1,72		
- TT	16	8	6	3,6	0,44	0,17-1,18		
Dominante:								
- CC	109	54,5	92	54,4	1		0,990	512,9
- CT-TT	91	45,5	77	45,6	1	0,66-1,51		
Recesivo:								
- CC-CT	184	92	163	96,4	1		0,065	509,6
- TT	16	8	6	3,6	0,42	0,16-1,11		
S-domiante:								
- CC-TT	125	62,5	98	58	1		0,377	512,2
- CT	75	37,5	71	42	1,21	0,79-1,84		
Aditivo:	200	54,2	169	45,8	0,89	0,63-1,25	0,488	512,5

2.3.2. Distribución de las variantes alélicas de LMP7.

Se tipó el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) del gen LMP7 (rs2071543) en 200 pacientes de cáncer de mama y 169 controles sanos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las frecuencias de los genotipos y alelos

entre pacientes y controles. La siguiente tabla muestra la distribución de las frecuencias de genotipos y alelos en los dos grupos.

TABLA 36: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos del polimorfismo de LMP7 en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		P
		n= 200	(%)	n= 169	(%)	
LMP7 (rs2071543)	CC	154	77	124	73,37	0,421
	CA	43	21,5	44	26,03	0,307
CAG->AAG (Gln-Lys)	AA	3	1,5	1	0,59	0,387
	C	351	87,75	292	86,39	
	A	49	12,25	46	13,60	
	HWE	1		0,318		

Igualmente, para el análisis de este polimorfismo se tuvieron en cuenta los cinco modelos genéticos anteriores, no encontrándose asociación estadísticamente significativa entre el riesgo de cáncer de mama y este polimorfismo (Tabla 37).

TABLA 37: Asociación entre el polimorfismo del gen de LMP7 y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	P	AIC
LMP7 (rs2071543)	n=200 (%)		n=169 (%)					
Codominanet:								
- CC	154	77	124	73,4	1		0,428	513,2
- CA	43	21,5	44	26	1,27	0,78-2,06		
- AA	3	1,5	1	0,6	0,41	0,04-4,03		
Dominante:								
- CC	154	77	124	73,4	1		0,421	512,3
- CA-AA	46	23	45	26,6	1,21	0,76-1,95		
Recesivo:								
- CC-CA	197	98,5	168	99,4	1		0,387	512,2
- AA	3	1,5	1	0,6	0,39	0,04-3,79		
S-dominante:								
- CC-AA	157	78,5	125	74	1		0,307	511,9
- CA	43	21,5	44	26	1,29	0,79-2,08		
Aditivo:	200	54,2	169	45,8	1,14	0,73-1,77	0,573	512,6

2.4. Distribución de las variantes alélicas de TAP1 y TAP2.

2.4.1. Distribución de las variantes alélicas de TAP1.

Se genotiparon dos SNP para el gen TAP 1: TAP 1.1 (rs1057141) y TAP 1.2 (rs1135216) en 200 pacientes con cáncer de mama y 169 controles sanos. La siguiente tabla muestra la distribución de frecuencias de genotipos y alelos para cada uno de los polimorfismos en pacientes y controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos y alelos entre los dos grupos, como puede observarse.

TABLA 38: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos de los polimorfismos TAP 1.1 y TAP 1.2 en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		P
		n= 200	(%)	n= 169	(%)	
TAP 1.1 (rs1057141)	AA	144	72	117	69,2	0,560
	AG	51	25,5	50	29,6	0,380
	GG	5	2,5	2	1,2	0,345
	A	339	84,75	284	84,02	
	G	61	15,25	54	15,97	
	HWE	0,786		0,256		
TAP 1.2 (rs1135216)	AA	148	74	122	72,2	0,594
	AG	49	24,5	46	27,2	0,552
	GG	3	1,5	1	0,6	0,387
	A	345	86,25	290	85,79	
	G	55	13,75	48	14,20	
	HWE	1		0,204		

Para el análisis de estos dos polimorfismos del gen TAP 1 se usaron 5 modelos genéticos (codominante, dominante, recesivo, sobre-dominante y aditivo). La significación estadística en cualquier modelo se consideró como una posible asociación del polimorfismo con el riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los dos polimorfismos estudiados de TAP 1 y el riesgo de cáncer de mama en la población estudiada (Tablas 39 y 40).

TABLA 39: Asociación entre el polimorfismo TAP 1.1 y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	p	AIC
TAP 1.1	n=200 (%)		n=169 (%)					
Codominante:								
- AA	144	72	117	69,2	1		0,465	513,4
- AG	51	25,5	50	29,6	1,21	0,76-1,91		
- GG	5	2,5	2	1,2	0,49	0,09-2,58		
Dominante:								
- AA	144	72	117	69,2	1		0,560	512,6
- AG-GG	56	28	52	30,8	1,14	0,73-1,79		
Recesivo:								
- AA-AG	195	97,5	167	98,8	1		0,345	512
- GG	5	2,5	2	1,2	0,47	0,09-2,44		
S-dominante:								
- AA-GG	149	74,5	119	70,4	1		0,380	512,2
- AG	51	25,5	50	29,6	1,23	0,78-1,94		
Aditivo:	200	54,2	169	45,8	1,06	0,70-1,59	0,782	512,9

TABLA 40: Asociación entre el polimorfismo TAP 1.2 y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	P	AIC
TAP 1.2	n=200 (%)		n=169 (%)					
Codominante:								
- AA	148	74	122	72,2	1		0,594	513,9
- AG	49	24,5	46	27,2	1,14	0,71-1,82		
- GG	3	1,5	1	0,6	0,40	0,04-3,94		
Dominante:								
- AA	148	74	122	72,2	1		0,695	512,8
- AG/GG	52	26	47	27,8	1,10	0,69-1,74		
Recesivo:								
- AA-AG	197	98,5	168	99,4	1		0,387	512,2
- GG	3	1,5	1	0,6	0,39	0,04-3,79		
S-dominante:								
- AA-GG	151	75,4	123	72,8	1		0,552	512,6
- AG	49	24,5	46	27,2	1,15	0,72-1,84		
Aditivo:	200	50,2	169	45,8	1,04	0,68-1,61	0,854	512,9

2.4.2. Distribución de las variantes alélicas de TAP 2.

Se analizaron tres SNP para el gen TAP 2: TAP 2.1 (rs1800454), TAP 2.2 (rs241447) y TAP 2.3 (rs241448) en pacientes con cáncer de mama y controles sanos, según la siguiente distribución:

TABLA 41: Distribución de los polimorfismos estudiados.

Polimorfismo	Pacientes (n)	Controles (n)
TAP 2.1	200	169
TAP 2.2	198	150
TAP 2.3	200	165

Las siguientes tablas muestran la distribución de las frecuencias de genotipos y alelos para cada uno de los polimorfismos en pacientes y controles. Únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las frecuencias de genotipos y alelos entre los dos grupos para el polimorfismo TAP 2.1, siendo el genotipo GG más frecuente en controles que en pacientes ($p=0,008$) y los genotipos AG y AA más frecuentes en pacientes que en controles con una p de 0,043 y 0,033 respectivamente.

TABLA 42: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos del polimorfismo TAP 2.1 en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		p
		n= 200	(%)	n= 169	(%)	
TAP 2.1 (rs1800454)	GG	141	70,5	139	82,2	0,008
	AG	53	26,5	30	17,8	0,043
	AA	6	3	0	0	0,033
	G	335	83,75	308	91,12	
	A	65	16,25	30	8,87	
	HWE	0,793		0,367		

TABLA 43: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos del polimorfismo TAP 2.2 en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		p
		n= 198	(%)	n= 150	(%)	
TAP 2.2 (rs241447)	AA	109	55,1	79	52,7	0,658
	AG	70	35,4	58	38,7	0,525
	GG	19	9,6	13	8,7	0,765
	A	288	72,72	216	72	
	G	108	27,27	84	28	
	HWE	0,150		0,684		

TABLA 44: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos del polimorfismo TAP 2.3 en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		p
		n= 200	(%)	n= 165	(%)	
TAP 2.3 (rs241448)	TT	107	53,5	77	46,7	0,193
	CT	74	37	75	45,5	0,102
	CC	19	9,5	13	7,9	0,584
	T	288	72	229	69,39	
	C	112	28	101	30,60	
	HWE	0,291		0,463		

Para el análisis de estos tres polimorfismos, al igual que en los genes anteriores, se usaron 5 modelos genéticos (codominante, dominante, recesivo, sobre-dominante y aditivo). La significación estadística en cualquier modelo se consideró como una posible asociación del polimorfismo en concreto, con la susceptibilidad de padecer cáncer de mama. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo TAP 2.1 y el riesgo de cáncer de mama, siendo el modelo codominante el más significativo, como podemos observar en la tabla 45. En cambio, no hubo asociación significativa cuando se compararon los polimorfismos TAP 2.2 y TAP 2.3 en pacientes y controles con el riesgo de cáncer de mama (Tablas 46 y 47).

TABLA 45: Asociación entre el polimorfismo TAP 2.1 y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	P	AIC
TAP 2.1	n=200 (%)		n=169 (%)					
Codominante:								
- GG	141	70,5	139	82,2	1		0,004	502,8
- AG	53	26,5	30	17,8	0,57	0,35-0,95		
- AA	6	3	0	0	0	0		
Dominante:								
- GG	141	70,5	139	82,2	1		0,008	505,9
- AG-AA	59	29,5	30	17,8	0,52	0,31-0,85		
Recesivo:								
- GG-AG	194	97	169	100	1		0,033	505,5
- AA	6	3	0	0	0	0		
S-dominante:								
- GG-AA	147	73,5	139	82,2	1		0,043	508,9
- AG	53	26,5	30	17,8	0,60	0,36-0,99		
Aditivo:	200	54,2	169	45,8	0,5	0,31-0,79	0,004	503,7

TABLA 46: Asociación entre el polimorfismo TAP 2.2 y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	P	AIC
TAP 2.2	n=198 (%)		n=150 (%)					
Codominante:								
- AA	109	55,1	79	52,7	1		0,808	481,4
- AG	70	35,4	58	38,7	1,14	0,73-1,80		
- GG	19	9,6	13	8,7	0,94	0,44-2,02		
Dominante:								
- AA	109	55,1	79	52,7	1		0,658	479,6
- AG-GG	89	44,9	71	47,3	1,10	0,72-1,68		
Recesivo:								
- AA-AG	179	90,4	137	91,3	1		0,765	479,7
- GG	19	9,6	13	8,7	0,89	0,43-1,87		
S-dominante:								
- AA-GG	128	64,4	92	61,3	1		0,525	479,4
- AG	70	35,4	58	38,7	1,15	0,74-1,79		
Aditivo:	198	56,9	150	43,1	1,03	0,75-1,43	0,837	479,7

TABLA 47: Asociación entre el polimorfismo TAP 2.3 y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	P	AIC
TAP 2.3	n=200 (%)		n=165 (%)					
Codominante:								
- TT	107	53,5	77	46,7	1		0,260	505,9
- CT	74	37	75	45,5	1,41	0,91-2,18		
- CC	19	9,5	13	7,9	0,95	0,44-2,04		
Dominante:								
- TT	107	53,5	77	46,7	1		0,193	504,9
- CT-CC	93	46,5	88	53,3	1,31	0,87-1,99		
Recesivo:								
- TT-CT	181	90,5	152	92,1	1		0,584	506,3
- CC	19	9,5	13	7,9	0,81	0,39-1,70		
S-dominante:								
- TT-CC	126	63	90	54,5	1		0,102	504,0
- CT	74	37	75	45,5	1,42	0,93-2,16		
Aditivo:	200	54,8	165	45,2	1,13	0,82-1,56	0,443	506,0

2.5. Distribución de los alelos de NKG2D.

Se genotipó el punto polimórfico de NKG2D Thr72Ala en 200 pacientes con cáncer de mama y 169 controles sanos. La tabla 48 muestra la distribución de las frecuencias de genotipos y alelos para este polimorfismo en pacientes y controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las frecuencias de genotipos y alelos entre los dos grupos.

TABLA 48: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos del polimorfismo NKG2D Thr72Ala en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		P
		n= 200	(%)	n= 169	(%)	
NKG2D Thr72Ala	GG	134	67	106	62,7	0,390
	AG	61	30,5	58	34,3	0,434
	AA	5	2,5	5	3	0,787
	G	329	82,25	270	79,88	
	A	71	17,75	68	20,11	
	HWE	0,634		0,477		

Para el análisis de este polimorfismo del gen NKG2D se usaron 5 modelos genéticos (codominante, dominante, recesivo, sobre-dominante y aditivo). La significación estadística en cualquier modelo se consideró como una posible asociación del polimorfismo con la susceptibilidad de padecer cáncer de mama. No se encontró asociación estadísticamente significativa cuando se comparó este polimorfismo en pacientes y controles con el riesgo de cáncer de mama (Tabla 49).

TABLA 49: Asociación entre el polimorfismo NKG2DThr72Ala y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	p	AIC
Thr72Ala	n=200 (%)		n=169 (%)					
NKG2D								
Codominante:								
- GG	134	67	106	62,7	1		0,689	514,2
- AA	61	30,5	58	34,3	1,2	0,77-1,87		
- AA	5	2,5	5	3	1,26	0,36-4,48		
Dominante:								
- GG	134	67	106	62,7	1		0,390	512,2
- AG-AA	66	33	63	37,3	1,21	0,79-1,85		
Recesivo:								
- GG-AG	195	97,5	164	97	1		0,787	512,9
- AA	5	2,5	5	3	1,19	0,34-4,18		
S-dominante:								
- GG-AA	139	69,5	111	65,7	1		0,434	512,3
- AG	61	30,5	58	34,3	1,19	0,77-1,84		
Aditivo:	200	54,2	169	45,8	1,18	0,80-1,72	0,399	512,2

2.6. Distribución de las variantes alélicas de CTLA-4.

Se analizaron dos puntos polimórficos del gen CTLA-4 (CTLA-4+49 A/G y CTLA-4-1661 A/G) en 200 pacientes con cáncer de mama y 169 controles sanos. La siguiente tabla muestra la distribución de las frecuencias de genotipos y alelos de cada polimorfismo en pacientes y controles. Para el polimorfismo CTLA-4+49 A/G, en el grupo control, se observó que el alelo A fue significativamente más frecuente que el alelo G ($p=0,020$), sin embargo, no se encontraron otras diferencias en la distribución de genotipos entre pacientes y controles. En el caso del polimorfismo CTLA-4-1661 A/G, en el grupo de pacientes se objetivo que el alelo A fue

significativamente más frecuente que el alelo G ($p = 0,020$). Además, se encontró otra diferencia estadísticamente significativa en la distribución de genotipos entre los dos grupos, siendo el genotipo GG más frecuente en el grupo control que en el de pacientes, con una $p = 0,012$.

TABLA 50: Distribución de frecuencias de genotipos y alelos de los polimorfismo en CTLA-4 en pacientes y controles.

SNP	Genotipo/Alelo	Pacientes		Controles		p
		n= 200	(%)	n= 169	(%)	
CTLA4+49 A/G	AA	105	52,5	95	56,2	0,475
	AG	81	40,5	55	32,5	0,113
	GG	14	7	19	11,2	0,155
	A	291	72,75	245	72,48	
	G	109	27,25	93	27,51	
	HWE	0,859		0,020		
CTLA4-1661 A/G	AA	134	67	102	62,1	0,329
	AG	65	32,5	55	33,7	0,802
	GG	1	0,5	7	4,1	0,012
	A	333	83,25	267	78,99	
	G	67	16,75	71	21	
	HWE	0,020		1		

Por otra parte, no se encontró asociación significativa cuando se comparó el polimorfismo CTLA-4+49 A/G en pacientes y controles con el riesgo de cáncer de mama (Tabla 51). En cambio, hubo una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo CTLA-4-1661 A/G y el riesgo de cáncer de mama bajo los modelos genéticos recesivo y codominante ($p = 0,012$ y $p = 0,038$ respectivamente; Tabla 52).

TABLA 51: Asociación entre el polimorfismo CTLA-4+49 A/G y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	p	AIC
CTLA4+49 A/G	n=200	(%)	n=169	(%)				
Codominante:								
- AA	105	52,5	95	56,2	1		0,160	511,3
- AG	81	40,5	55	32,5	0,75	0,48-1,17		
- GG	14	7	19	11,2	1,5	0,71-3,16		
Dominante:								
- AA	105	52,5	95	56,2	1		0,475	512,4
- AG-GG	95	47,5	74	43,8	0,86	0,57-1,30		
Recesivo:								
- AA-AG	186	93	150	88,8	1		0,155	510,9
- GG	14	7	19	11,2	1,68	0,82-3,47		
S-dominate:								
- AA-GG	119	59,5	114	67,5	1		0,113	510,4
- AG	81	40,5	55	32,5	0,71	0,46-1,09		
Aditivo:	200	54,2	169	45,8	1,01	0,74-1,39	0,938	512,9

TABLA 52: Asociación entre el polimorfismo CTLA-4-1661 A/G y el riesgo de cáncer de mama.

Genotipo	Pacientes		Controles		OR	IC	p	AIC
CTLA4-1661 A/G	n=200 (%)		n=169 (%)					
Codominante:								
- AA	134	67	105	62,1	1		0,038	508,4
- AG	65	32,5	57	33,7	1,12	0,72-1,73		
- GG	1	0,5	7	4,1	8,93	1,08-73,7		
Dominante:								
- AA	134	67	105	62,1	1		0,329	512,0
- AG-GG	66	33	64	37,9	1,24	0,81-1,90		
Recesivo:								
- AA-AG	199	99,5	162	95,9	1		0,012	506,7
- GG	1	0,5	7	4,1	8,60	1,05-70,6		
S-dominante:								
- AA-GG	135	67,5	112	66,3	1		0,802	512,9
- AG	65	32,5	57	33,7	1,06	0,68-1,63		
Aditivo:	200	54,2	169	45,8	1,36	0,92-2,01	0,122	510,5

A continuación se presenta una tabla resumen de los análisis de asociación de todos los polimorfismos estudiados bajo modelos genéticos:

TABLA 53: Resumen del análisis de asociación de los polimorfismos estudiados (a excepción de HLA Y MICA).

SNP	Codominante	Dominante	Recesivo	S-dominante	Aditivo.
CTLA4-49	0,160	0,475	0,155	0,113	0,938
CTLA4-1661	0,038	0,329	0,012	0,802	0,122
NKG2DT72A	0,689	0,390	0,787	0,434	0,399
LMP2	0,160	0,990	0,065	0,377	0,488
LMP7	0,428	0,421	0,387	0,307	0,573
TAP1.1	0,465	0,560	0,345	0,380	0,782
TAP1.2	0,594	0,695	0,387	0,552	0,854
TAP2.1	0,004	0,008	0,033	0,043	0,004
TAP2.3	0,255	0,104	0,456	0,200	0,102

3. Análisis comparativo de los haplotipos LMP7/TAP 2.1 entre pacientes y controles.

En nuestro trabajo se seleccionó para su estudio el siguiente haplotipo LMP7/TAP 2.1 que contenía los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) rs2071543 (de LMP7) y rs1800454 (de TAP 2.1). Estos genes se localizan muy próximos entre sí, y este haplotipo en concreto, se ha relacionado en otros trabajos con el riesgo de neoplasias (Cao B et al. 2005).

La siguiente tabla muestra la distribución de las frecuencias estimadas de los haplotipos para los genes LMP7/TAP 2.1 en pacientes y controles sanos.

TABLA 54: Distribución de las frecuencias estimadas de los haplotipos para los genes LMP7/TAP 2.1 en pacientes y controles.

Haplotipo	Loci	Pacientes	Controles	p
	LMP7/TAP 2.1	n (%)	n (%)	
A	Gln-Val	288 (72)	262 (77,5)	0,090
B	Lys-Val	37 (9,2)	42 (12,4)	0,188
C	Gln-Ile	55 (13,8)	26 (7,7)	0,009
D	Lys-Ile	0	0	
Desconocido		20 (5)	8 (2,4)	
Total		400	388	

Se construyeron un total de 4 haplotipos (A, B, C y D). El haplotipo D no estaba representado en ninguno de los dos grupos estudiados. El haplotipo C resultó ser más frecuente en pacientes con cáncer de mama cuando se comparó con el grupo control, de una forma estadísticamente significativa ($p=0,009$).

4. Análisis multivariante de los polimorfismos genéticos entre pacientes y controles.

Se construyó un modelo de regresión logística multivariante para predecir caso en función de las variables genéticas CTLA-4-1661, TAP 2.1 y LMP2. La bondad de ajuste para el modelo fue buena ($p=0,99$) en el test de Hosmer-Lemeshow, con un área bajo la curva ROC de 0,59 (0,53-0,64).

Se encontró significación estadística en CTLA-4-1661 y TAP 2.1. Los resultados pusieron de manifiesto que para el genotipo GG del polimorfismo CTLA-4-1661 se obtenía una OR= 0,11 (IC: 0,006-0,689). Por otra parte para el genotipo AG de TAP2.1 la OR fue de 1,72 (IC: 1,044-2,901). Estos resultados confirmaron los obtenidos en el análisis univariante, reforzando la implicación de estos genes en el CM en nuestro estudio.

5. Análisis comparativo de los diferentes polimorfismos genéticos en pacientes en función de variables clínicas de la enfermedad:

Para este apartado se tuvieron en cuenta las siguientes variables clínicas relacionadas con la enfermedad:

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

- Estado hormonal al diagnóstico.
- Enfermedad bilateral al diagnóstico.
- Tipo histológico del tumor.
- Grado histológico del tumor.
- Afectación ganglionar al diagnóstico.
- Afectación metastática al diagnóstico.
- Estadio patológico de la enfermedad.
- Subtipo molecular del tumor.

Se realizó un análisis comparativo para cada uno de los polimorfismos genéticos estudiados en función de cada variable clínica expuesta anteriormente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos estudiados cuando fueron analizados en función de las siguientes variables clínicas: enfermedad bilateral al diagnóstico (Tabla 55), tipo (Tabla 56) y grado histológico del tumor (Tabla 57), afectación ganglionar (Tabla 58) y metastática al diagnóstico (Tabla 59).

TABLA 55: Descriptivo de los polimorfismos en función de la presencia de enfermedad bilateral al diagnóstico.

Variable	Valores	n Sí	(%)	n No	(%)	n Total	(%)
CTLA4-49	AA	6	54,5	99	52,4	105	52,5
	AG	5	45,5	76	40,2	81	40,5
	GG	0	0	14	7,4	14	7
	p= 1,00	todos	11	100	189	100	100
CTLA4-1661	AA	5	45,5	129	68,2	134	67
	AG	6	54,5	59	31,2	65	32,5
	GG	0	0	1	0,5	1	0,5
	p= 0,22	todos	11	100	189	100	100
NKG2DT72A	AA	0	0	5	2,6	5	2,5
	AG	4	36,4	57	30,2	61	30,5
	GG	7	63,6	127	67,2	134	67
	p= 0,80	todos	11	100	189	100	100
LMP2	CC	7	63,6	102	54	109	54,5

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

p= 0,62	CT	3	27,3	72	38,1	75	37,5
	TT	1	9,1	15	7,9	16	8
	todos	11	100	189	100	200	100
LMP7	CC	8	72,7	146	77,2	154	77
	CA	3	27,3	40	21,2	43	21,5
	AA	0	0	3	1,6	3	1,5
	todos	11	100	189	100	200	100
p= 0,74	CC	8	72,7	146	77,2	154	77
	CA	3	27,3	40	21,2	43	21,5
	AA	0	0	3	1,6	3	1,5
	todos	11	100	189	100	200	100
TAP 1.1	AA	6	54,5	138	73	144	72
	AG	4	36,4	47	24,9	51	25,5
	GG	1	9,1	4	2,1	5	2,5
	todos	11	100	189	100	200	100
p= 0,15	AA	6	54,5	138	73	144	72
	AG	4	36,4	47	24,9	51	25,5
	GG	1	9,1	4	2,1	5	2,5
	todos	11	100	189	100	200	100
TAP 1.2	AA	7	63,6	141	74,6	148	74
	AG	3	27,3	46	24,3	49	24,5
	GG	1	9,1	2	1,1	3	1,5
	todos	11	100	189	100	200	100
p= 0,19	AA	7	63,6	141	74,6	148	74
	AG	3	27,3	46	24,3	49	24,5
	GG	1	9,1	2	1,1	3	1,5
	todos	11	100	189	100	200	100
TAP 2.1	GG	8	72,7	133	70,4	141	70,5
	AG	3	27,3	50	26,5	53	26,5
	GG	0	0	6	3,2	6	3
	todos	11	100	189	100	200	100
p= 1,00	GG	8	72,7	133	70,4	141	70,5
	AG	3	27,3	50	26,5	53	26,5
	GG	0	0	6	3,2	6	3
	todos	11	100	189	100	200	100
TAP 2.1	AA	5	45,5	104	55,6	109	55
	AG	5	45,5	65	34,8	70	35,4
	GG	1	9,1	18	9,6	19	9,6
	todos	11	100	187	100	198	100
p= 0,73	AA	5	45,5	104	55,6	109	55
	AG	5	45,5	65	34,8	70	35,4
	GG	1	9,1	18	9,6	19	9,6
	todos	11	100	187	100	198	100
TAP 2.3	TT	5	45,5	102	54	107	53,5
	CT	5	45,5	69	36,5	74	37

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

	CC	1	9,1	18	9,5	19	9,5
p= 0,93	todos	11	100	189	100	200	100

TABLA 56: Descriptivo de los polimorfismos en función del tipo histológico del tumor.

Variable	Valores	n Ductal (%)	n In situ (%)	n Lob (%)	n Mixto (%)	n Total (%)					
CTLA4-49	AA	93	2	66,7	8	72,7	2	33,3	105	52,5	
	AG	51,7	0	0	3	27,3	4	66,7	81	40,5	
	GG	71	1	33,3	0	0	2	0	14	7	
	todos	13	7,2	3	100	11	100	6	100	200	100
		180	100								
CTLA4-1661	AA	118	65,6	3	100	9	81,8	4	66,7	134	67
	AG	61	33,9	0	0	2	18,2	2	33,3	65	32,5
	GG	1	0,6	0	0	0	0	0	0	1	0,5
	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	100
NKG2DT72A	AA	4	2,22	0	0	1	9,1	0	0	5	2,5
	AG	55	30,6	2	66,7	4	36,4	0	0	61	30,5
	GG	121	67,2	1	33,3	6	54,5	6	100	134	67
	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	100
LMP2	CC	101	56,1	3	100	3	27,3	2	33,3	109	54,5
	CT	65	36,1	0	0	6	54,5	4	66,7	75	37,5
	TT	14	7,8	0	0	2	18,2	0	0	16	8
	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	100
LMP7	CC	136	75,6	2	66,7	10	90,9	6	100	154	77
	CA	42	23,3	0	0	1	9,1	0	0	43	21,5
	AA	2	1,1	1	33,3	0	0	0	0	3	1,5

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

p= 0,11	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	100
TAP 1.1	AA	130	72,2	2	66,7	9	81,8	3	50	144	72
	AG	45	25	1	33,3	2	18,2	3	50	51	25,5
	GG	5	2,8	0	0	0	0	0	0	5	2,5
p= 0,68	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	100
TAP 1.2	AA	133	73,9	2	66,7	9	81,8	4	66,7	148	74
	AG	44	24,4	1	33,3	2	18,2	2	33,3	49	26,5
	GG	3	1,7	0	0	0	0	0	0	3	3
p= 0,89	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	1,5
TAP 2.1	GG	126	70	3	100	7	63,6	5	83,3	141	70,5
	AG	48	26,7	0	0	4	36,4	1	16,7	53	26,5
	AA	6	3,3	0	0	0	0	0	0	6	3
p= 0,83	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	100
TAP 2.2	AA	98	55,1	3	100	4	36,4	4	66,7	109	55
	AG	62	34,8	0	0	6	54,5	2	33,3	70	35,4
	GG	18	10,1	0	0	1	9,1	0	0	19	9,6
p= 0,62	todos	178	100	3	100	11	100	6	100	198	100
TAP 2.3	TT	97	53,9	2	66,7	4	36,4	4	66,7	107	53,5
	CT	65	36,1	1	33,9	6	54,5	2	33,3	74	37
	CC	18	10	0	0	1	9,1	0	0	19	9,5
p= 0,88	todos	180	100	3	100	11	100	6	100	200	100

TABLA 57: Descriptivo de los polimorfismos en función del grado histológico del tumor.

Variable	Valores	n GH1	(%)	n GH2	(%)	n GH3	(%)	n Desc	(%)	N Total	(%)
CTLA4-49	AA	17	56,7	43	51,8	44	53	1	25	105	52,5
	AG	11	36,7	36	43,4	31	37,4	3	75	81	40,5
	GG	2	6,7	4	4,8	8	9,6	0	0	14	7
	p= 0,70	todos	30	100	83	100	83	100	4	100	200
CTLA4-1661	AA	20	66,7	59	71	53	63,9	2	50	134	67
	AG	10	33,3	24	28,9	30	36,1	1	25	65	32,5
	GG	0	0	0	0	0	0	1	25	1	0,5
	p= 0,08	todos	30	100	83	100	83	100	4	100	200
NKG2DT72A	AA	1	3,3	2	2,4	2	2,4	0	0	5	2,5
	AG	8	26,7	28	33,7	24	28,9	1	25	61	30,5
	GG	21	70	53	63,9	57	68,7	3	75	134	67
	p= 0,97	todos	30	100	83	100	83	100	4	100	200
LMP2	CC	16	55,3	44	53	48	57,8	1	25	19	54,5
	CT	11	36,7	34	41	27	32,5	3	75	75	37,5
	TT	3	10	5	6	8	9,6	0	0	16	8
	p= 0,65	todos	30	100	83	100	83	100	4	10	200
LMP7	CC	23	76,7	66	79,5	61	73,5	4	100	154	77
	CA	6	20	15	18,1	22	26,5	0	0	43	21,5
	AA	1	3,3	2	2,4	0	0	0	0	3	1,5
	p= 0,41	todos	30	100	83	100	83	100	4	100	200
TAP 1.1	AA	22	73,3	55	66,3	63	75,9	4	100	144	72
	AG	8	26,7	26	31,3	17	20,5	0	0	51	25,5
	GG	0	0	2	2,4	3	3,6	0	0	5	2,5

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

p= 0,54	todos	30	100	83	100	83	100	4	10	200	100
TAP 1.2	AA	22	73,3	58	69,9	64	77,1	4	100	148	74
	AG	8	26,7	24	28,9	17	20,5	0	0	49	24,5
	GG	0	0	1	1,2	2	2,4	0	0	3	1,5
p= 0,73	todos	30	100	83	100	83	100	4	100	200	100
TAP 2.1	GG	23	76,7	54	65,1	61	73,5	3	75	141	70,5
	AG	7	23,3	26	31,3	20	24,1	0	0	53	26,5
	AA	0	0	3	3,6	2	2,4	1	25	6	3
p= 0,28	todos	30	100	83	100	83	100	4	100	200	100
TAP 2.2	AA	20	69	45	54,9	42	50,6	2	50	109	55
	AG	5	17,2	30	36,6	33	39,8	2	50	70	35,4
	GG	4	13,8	7	8,5	8	9,6	0	0	19	9,6
p= 0,40	todos	29	100	82	100	83	100	4	100	198	100
TAP 2.3	TT	19	63,3	43	52,4	43	51,2	2	50	107	53,5
	CT	7	23,3	32	39	33	39,3	2	50	74	37
	CC	4	13,3	7	8,5	8	9,5	0	0	19	9,5
p= 0,73	todos	30	100	82	100	84	100	4	100	200	100

TABLA 58: Descriptivo de los polimorfismos en función de la afectación ganglionar al diagnóstico.

Variable	Valores	n N0	(%)	n N1	(%)	n N2	(%)	n N3	(%)	n Total	(%)
CTLA4-49	AA	47	50,5	33	49,2	17	68	7	58,3	105	52,5
	AG	37	39,8	31	46,3	7	28	4	33,3	81	40,5
	GG	9	9,7	3	4,5	1	4	1	8,3	14	7
	p= 0,53	todos	93	100	67	100	25	100	12	200	100
CTLA4-1661	AA	64	68,8	42	62,7	18	72	7	58,3	134	67
	AG	28	30,1	25	37,3	7	28	5	41,7	65	30,5
	GG	1	1,1	0	0	0	0	0	0	1	0,5
	p= 0,77	todos	93	100	67	100	25	100	12	200	100
NKG2DT72A	AA	2	2,1	2	3	1	4	0	0	5	2,5
	AG	28	30,1	24	35,8	6	24	1	8,3	61	30,5
	GG	63	67,7	41	61,2	18	72	11	91,7	134	67
	p= 0,46	todos	93	100	67	100	25	100	12	200	100
LMP2	CC	54	58,1	35	52,2	10	40	8	66,7	109	54,5
	CT	32	34,4	24	35,8	14	56	4	33,3	75	37,5
	TT	7	7,5	8	11,9	1	4	0	0	16	8
	p= 0,42	todos	93	100	67	100	25	100	12	200	100
LMP7	CC	76	81,7	47	70,2	20	80	8	66,7	154	77
	CA	15	16,1	19	28,4	5	20	4	33,3	43	21,5
	AA	2	2,1	1	1,5	0	0	0	0	3	1,5
	p= 0,45	todos	93	100	67	100	25	100	12	200	100
TAP 1.1	AA	69	74,2	45	67,2	18	72	9	75	144	72
	AG	22	23,7	20	29,9	6	24	3	25	51	25,5
	GG	2	2,1	2	3	1	4	0	0	5	2,5

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

p= 0,92	todos	93	100	67	100	25	100	12	100	200	100
TAP 1.2	AA	71	76,3	47	70,2	18	72	9	75	148	74
	AG	21	22,6	19	28,4	6	24	3	25	49	24,5
	GG	1	1,1	1	1,5	1	4	3	0	3	1,5
p= 0,84	todos	93	100	67	100	25	100	12	100	200	100
TAP 2.1	GG	68	73,1	43	64,2	20	80	8	66,7	141	70,5
	AG	23	24,7	22	32,8	4	16	4	33,3	53	26,5
	AA	2	2,1	2	3	1	4	0	0	6	3
p= 0,62	todos	93	100	67	100	25	100	12	100	200	100
TAP 2.2	AA	56	60,9	33	50	11	44	7	58,3	109	55
	AG	29	31,5	23	34,9	13	52	4	33,3	70	35,4
	GG	7	7,6	10	15,2	1	4	1	8,3	19	9,6
p= 0,36	todos	92	100	66	100	25	100	12	100	198	100
TAP 2.3	TT	55	59,1	33	48,5	10	41,7	7	58,3	107	53,5
	CT	31	33,3	25	36,8	13	54,2	4	33,3	74	37
	CC	7	7,5	10	14,7	1	4,2	1	8,3	19	9,5
p= 0,36	todos	93	100	68	100	24	100	12	100	200	100

TABLA 59: Descriptivo de los polimorfismos en función de la afectación metastática al diagnóstico.

Variable	Valores	n M0	(%)	n M1	(%)	n Total	(%)
CTLA4-49	AA	98	51,6	7	70	105	52,5
	AG	78	41	3	30	81	40,5
	GG	14	7,4	0	0	14	7
	p= 0,67	todos	190	100	10	100	100
CTLA4-1661	AA	127	66,8	7	70	134	67
	AG	62	32,6	3	30	65	32,5
	GG	1	0,5	0	0	1	0,5
	p= 1,00	todos	190	100	10	100	100
NKG2DT72A	AA	5	2,6	0	0	5	2,5
	AG	55	28,9	6	60	61	30,5
	GG	130	68,4	4	40	134	67
	p= 0,15	todos	190	100	10	100	100
LMP2	CC	102	53,7	7	70	109	54,5
	CT	73	38,4	2	20	75	37,5
	TT	15	7,9	1	10	16	8
	p= 0,44	todos	190	100	10	100	100
LMP7	CC	147	77,4	7	70	154	77
	CA	40	21,1	3	30	43	21,5
	AA	3	1,6	0	0	3	1,5
	p= 0,53	todos	190	100	10	100	100
TAP 1.1	AA	135	71	9	90	144	72
	AG	50	26,3	1	10	51	25,5
	GG	5	2,6	0	0	5	2,5

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

p= 0,58	todos	190	100	10	100	200	100
TAP 1.2	AA	139	73,2	9	90	148	74
	AG	48	25,3	1	10	49	24,5
	GG	3	1,6	0	0	3	1,5
p= 0,53	todos	190	100	10	100	200	100
TAP 2.1	GG	133	70	8	80	141	70,5
	AG	52	27,4	1	10	53	26,5
	AA	5	2,6	1	10	6	3
p= 0,18	todos	190	100	10	100	200	100
TAP 2.2	AA	102	54,3	7	70	109	55
	AG	68	36,2	2	20	70	35,4
	GG	18	9,6	1	10	19	9,6
p= 0,54	todos	188	100	10	100	198	100
TAP 2.3	TT	100	52,6	7	70	107	53,5
	CT	72	37,9	2	20	74	37
	CC	18	9,5	1	10	19	9,5
p= 0,49	todos	190	100	10	100	200	100

En cambio sí hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron los diferentes polimorfismos estudiados en función de las variables clínicas: estado hormonal al diagnóstico, estadio patológico de la enfermedad y subtipo molecular.

Así pues, para la variable estado hormonal al diagnóstico, la diferencia estadísticamente significativa se encontró en los polimorfismos de de TAP 1.1 ($p= 0,05$) y TAP 2.1 ($p= 0,03$). Para el polimorfismo TAP 1.1, el genotipo más frecuente encontrado en las pacientes fue el AA, seguido del AG, mientras que el GG fue muy poco frecuente. Sin embargo, cuando las pacientes se dividían en función de su estado hormonal al diagnóstico, para el grupo de mujeres premenopáusicas, estas diferencias se acentuaban aún más, representando el genotipo AA el 81% de ellas. Para el polimorfismo TAP 2.1, el genotipo GG resultó ser el más frecuente entre las pacientes, seguido del AG y muy poco representado el AA. En cambio, al

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

dividirse las pacientes en función de su estado hormonal al diagnóstico, para el grupo de mujeres peri-menopáusicas cambiaba esta tendencia, aumentando de forma significativa el genotipo AA con respecto a los otros subgrupos (Tabla 60).

TABLA 60: Descriptivo de los polimorfismos en función del estado hormonal al diagnóstico.

Variable	Valores	n Peri	(%)	n Pos	(%)	n Pre	(%)	n Total	(%)
CTLA4-49	AA	9	50	49	50	47	56	105	52,5
	AG	6	33,3	44	44,9	31	36,9	81	40,5
	GG	3	16,7	5	5,1	6	7,1	14	7
	p= 0,37	todos	18	100	98	100	84	100	100
CTLA4-1661	AA	11	61,1	67	68,4	56	66,7	134	67
	AG	7	38,9	30	30,6	28	33,3	65	32,5
	GG	0	0	1	1	0	0	1	0,5
	p= 0,85	todos	18	100	98	100	84	100	100
NKG2DT72A	AA	0	0	2	2	3	3,6	5	2,5
	AG	3	16,7	32	32,6	26	30,9	61	30,5
	GG	15	83,3	64	65,3	55	65,5	134	67
	p= 0,63	todos	18	100	98	100	84	100	100
LMP2	CC	11	61,1	52	53,1	46	54,8	109	54,5
	CT	5	27,8	39	39,8	31	36,9	75	37,5
	TT	2	11,1	7	7,1	7	8,3	16	8
	p= 0,87	todos	18	100	98	100	84	100	100
LMP7	CC	15	83,3	78	79,6	61	72,6	154	77
	CA	3	16,7	17	17,4	23	27,4	43	21,5
	AA	0	0	3	3,1	0	0	3	1,5
	p= 0,26	todos	18	100	98	100	84	100	100
TAP 1.1	AA	10	55,6	66	67,3	68	81	144	72

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

p= 0,05	AG	7	39,9	30	30	14	16,7	51	25,2
	GG	1	5,6	2	2	2	2,4	5	2,5
	todos	18	100	98	100	84	100	200	100
TAP 1.2	AA	11	61,1	68	69,4	69	82,1	148	74
	AG	7	38,9	28	28,6	14	16,7	49	24,5
	GG	0	0	2	2	1	1,2	3	1,5
p= 0,13	todos	18	100	98	100	84	100	200	100
TAP 2.1	GG	12	66,7	77	78,6	52	61,9	141	70,5
	AG	4	22,2	20	20,4	29	34,5	53	26,5
	AA	2	11,1	1	1	3	3,6	6	3
p= 0,03	todos	18	100	98	100	84	100	200	100
TAP 2.2	AA	12	66,7	56	58,3	41	48,8	109	55
	AG	5	27,8	31	32,3	34	40,5	70	35,4
	GG	1	5,6	9	9,4	9	10,7	19	9,6
	todos	18	100	96	100	84	100	198	100
TAP 2.3	TT	11	61,1	54	55,1	42	50	107	53,5
	CT	6	33,3	33	35,7	33	39,3	74	37
	CC	1	5,6	9	9,2	9	10,7	19	9,5
p= 0,93	todos	18	100	98	100	84	100	200	100

En cuanto a la variable estadio patológico de la enfermedad, la diferencia con significación estadística se encontró en el polimorfismo LMP7 ($p= 0,01$). Para este polimorfismo en concreto, el genotipo CC resultó ser el más frecuente entre las pacientes estudiadas, seguido del genotipo CA, y muy poco frecuente el AA. En cambio, cuando las pacientes se clasificaban según estadio de la enfermedad, tanto para el estadio 0 (Tis) y para el estadio IIIB, el genotipo AA aumentaba de forma significativa con respecto a los otros estadios, incluso, no estando presente el genotipo CC en el estadio IIIB (Tabla 61).

TABLA 61: Descriptivo de los polimorfismos en función del estadio patológico de la enfermedad.

Variable	Valores	nTis(%)	nIA(%)	nIIA(%)	nIIB(%)	nIIIA(%)	nIIIB(%)	nIIIC(%)	nIV(%)	nTotal(%)
CTLA4+49	AA	4 80	26 51	31 48,4	15 41,1	15 65,2	3 75	4 44,4	6 85,7	105 52,5
	AG	0 0	21 41,2	28 43,8	17 50	7 30,4	1 25	4 44,4	1 14,3	81 40,5
	GG	1 20	4 7,8	5 7,8	2 5,9	1 4,3	0 0	1 11,1	0 0	14 7
	p= 0,60	todos	5 100	51 100	64 100	31 100	23 100	4 100	9 100	7 100
CTLA4-1661	AA	4 80	39 76,5	35 54,7	22 64,7	17 73,9	4 100	6 66,7	4 57,1	134 67
	AG	1 20	12 23,5	28 43,8	12 35,3	6 26,1	0 0	3 33,3	3 42,9	65 32,5
	GG	0 0	0 0	1 1,6	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0,5
	p= 0,41	todos	5 100	51 100	64 100	34 100	23 100	4 100	9 100	7 100
NKG2D-T72A	AA	0 0	1 2	1 1,6	2 5,9	1 4,3	0 0	0 0	0 0	5 2,5
	AG	3 60	17 33,3	19 29,7	12 35,3	4 17,4	0 0	0 0	4 57,1	61 30,5
	GG	2 40	33 64,7	44 68,8	20 58,8	18 78,3	4 100	9 9	3 42,9	134 67
	p= 0,21	todos	5 100	51 100	64 100	34 100	23 100	4 100	9 100	7 100
LMP2	CC	4 80	29 56,9	33 51,6	19 55,9	8 34,8	3 75	6 66,7	5 71,4	109 54,5
	CT	1 20	18 35,3	26 40,6	10 29,4	14 60,9	1 25	3 33,3	1 14,3	75 37,5
	TT	0 0	4 7,8	5 7,8	5 14,7	1 4,3	0 0	0 0	1 14,3	16 8
	p= 0,58	todos	5 100	51 100	54 100	34 100	23 100	4 100	9 100	7 100
LMP7	CC	4 80	38 74,5	53 82,8	27 79,4	18 78,3	0 0	7 77,8	4 57,1	154 77
	CA	0 0	13 25,5	10 15,6	7 20,6	5 21,7	3 75	2 22,2	3 42,9	43 21,5
	AA	1 20	0 0	1 1,6	0 0	0 0	1 25	0 0	0 0	3 1,5
	p= 0,01	todos	5 100	51 100	64 100	34 100	23 100	4 100	9 100	7 100
TAP 1.1	AA	4 80	40 78,4	42 65,6	23 67,5	17 73,9	3 75	6 66,7	6 85,7	144 72
	AG	1 20	11 21,6	20 31,2	9 26,5	5 21,7	1 25	3 33,3	1 14,3	51 25,5
	GG	0 0	0 0	2 3,1	2 5,9	1 4,3	0 0	0 0	0 0	5 2,5
	p= 0,90	todos	5 100	51 100	64 100	34 100	18 100	4 100	9 100	7 100
TAP 1.2	AA	4 80	41 80,4	43 67,2	25 73,5	17 73,9	3 75	6 66,7	6 85,7	148 74
	AG	1 20	10 19,6	20 31,2	8 23,5	5 21,7	1 25	3 33,3	1 14,3	49 24,5
	GG	0 0	0 0	1 1,6	1 2,9	1 4,3	0 0	0 0	0 0	3 1,5
	p= 0,88	todos	5 100	51 100	64 100	34 100	23 100	4 100	9 100	7 100

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

TAP 2.1	GG	4 80	39 76,5	41 64,1	22 64,7	18 78,3	3 75	6 66,7	6 85,7	141 70,5
	GA	1 20	12 23,5	21 32,8	10 29,4	4 17,4	1 25	3 33,3	1 14,3	53 26,5
	AA	0 0	0 0	2 3,1	2 5,9	1 4,3	0 0	0 0	0 0	6 3
	p= 0,85	todos	5 100	51 100	64 100	34 100	23 100	4 100	9 100	7 100
TAP 2.2	AA	5 100	30 60	36 57,1	16 47,1	9 39,1	1 25	5 55,6	5 71,4	109 55
	AG	0 0	17 34	18 28,6	16 47,1	13 56,5	1 25	3 33,3	1 14,3	70 35,4
	GG	0 0	3 6	9 14,3	2 5,9	1 4,3	2 50	1 11,1	1 14,3	19 9,6
	p= 0,11	todos	5 100	50 100	63 100	34 100	23 100	4 100	9 100	7 100
TAP 2.3	TT	4 80	31 60,8	34 53,1	17 48,6	8 36,4	1 25	5 55,6	5 71,4	107 53,5
	CT	1 20	17 33,5	21 32,8	16 45,7	13 59,1	1 25	3 33,3	1 14,3	71 37
	CC	0 0	3 5,9	9 14,1	2 5,7	1 4,5	2 50	1 11,1	1 14,3	19 9,5
	p= 0,21	todos	5 100	51 100	64 100	35 100	22 100	4 100	9 100	7 100

Por último, para la variable subtipo molecular, los polimorfismos donde se encontraron significación estadística fueron CTLA4+49 A/G ($p= 0,02$) y TAP 2.3 ($p= 0,02$). Para CTLA4+49 A/G, el genotipo AA fue el más frecuente en el grupo de nuestras pacientes con cáncer de mama, seguido del genotipo AG y el menos frecuente el GG. En cambio, cuando las pacientes se dividían en función del subtipo molecular, en los subgrupos triple negativo y luminal B-Her2+ se modificaba esta tendencia, siendo el genotipo más frecuente en ellos el AG. Para el polimorfismo TAP 2.3, el genotipo TT resultó ser el más frecuente en nuestras pacientes con cáncer de mama, seguido del CT y el menos frecuente el CC. En cambio, cuando se procedía a la división de las pacientes en función del subtipo molecular, para el subgrupo luminal B/Her2+ se modificaba esta frecuencia, siendo el genotipo más representativo el CT, seguido del TT (Tabla 62).

TABLA 62: Descriptivo de los polimorfismos en función del subtipo molecular.

Variable	Valores	nHer2(%)		nLumA(%)		nLumB/Her2(%)		nLumB/Her2+(%)		nTriple(%)		nTotal(%)	
CTLA4-49	AA	9	56,2	36	60	45	56,2	8	32	6	33,3	105	52,5
	AG	4	25	23	38,3	29	36,2	16	64	9	50	81	40,5
	GG	3	18,8	1	1,7	6	7,5	1	4	3	16,7	14	7
p= 0,02	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
CTLA4-1661	AA	14	87,5	37	60	53	66,2	18	72	11	61,1	134	67
	AG	2	12,5	23	38,3	26	32,5	7	28	7	38,9	65	32,5

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

p= 0,49	GG	0	0	0	1,7	1	1,2	0	0	0	0	1	0,5
	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
NKG2DT72A	AA	0	0	3	5	1	1,2	1	4	0	0	5	2,5
	AG	7	43,8	17	28,3	24	30	7	28	5	27,8	61	30,5
	GG	9	56,2	40	66,7	55	68,8	17	68	13	72,2	134	67
p= 0,85	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
LMP2	CC	8	50	24	40	48	60	17	68	11	61,1	109	54,5
	CT	6	37,5	30	50	27	33,8	7	28	5	27,8	75	37,5
	TT	2	12,5	6	10	5	6,2	1	4	2	11,1	16	8
p= 0,28	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
LMP7	CC	11	68,8	50	83,3	58	72,5	19	76	15	83,3	154	77
	CA	6	31,2	8	13,3	21	26,2	6	24	3	16,7	43	21,5
	AA	0	0	2	3,3	1	1,2	0	0	0	0	3	1,5
p= 0,56	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
TAP 1.1	AA	14	87,5	46	76,7	54	67,5	18	72	11	61,1	144	72
	AG	2	12,5	13	21,7	24	30	6	24	6	33,3	51	25,5
	GG	0	0	1	1,7	2	2,5	1	4	1	5,6	5	2,5
p= 0,63	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
TAP 1.2	AA	14	87,5	47	78,3	57	71,2	18	72	11	61,1	148	74
	AG	2	12,5	12	20	21	26,2	7	28	7	38,9	49	24,5
	GG	0	0	1	1,7	2	2,5	0	0	0	0	3	1,5
p= 0,70	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
TAP 2.1	GG	12	75	36	60	59	73,8	21	84	12	66,7	141	70,5
	AG	4	25	23	38,3	17	21,2	4	16	5	27,8	53	26,5
	AA	0	0	1	1,7	4	5	0	0	1	5,6	6	3
p= 0,29	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200	100
TAP 2.2	AA	7	43,8	36	60	43	55,1	9	36	13	72,2	109	55
	AG	6	37,5	19	31,7	29	37,2	12	48	4	22,2	70	35,4
	GG	3	18,8	5	8,3	6	7,7	4	16	1	5,6	19	9,6
p= 0,13	todos	16	100	60	100	78	100	25	100	18	100	198	100

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

TAP 2.3	TT	7	43,8	37	61,7	41	51,2	9	36	13	72,2	107	53,5
	CT	6	37,5	18	30	33	41,2	12	48	4	22,2	74	37
	CC	3	18,8	5	8,3	6	7,5	4	16	1	5,6	19	9,5
	p= 0,02	todos	16	100	60	100	80	100	25	100	18	100	200

6. Análisis de parámetros de eficacia de tratamiento en función de los polimorfismos genéticos analizados.

Se analizaron los parámetros de eficacia de tratamiento (SG y SLE) en función de cada uno de los polimorfismos genéticos estudiados en el grupo de pacientes total, y en los subgrupos de pacientes que fallecieron y que habían recaído de su enfermedad a lo largo del seguimiento.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron ambos parámetros de eficacia teniendo en cuenta los polimorfismos genéticos en el grupo de pacientes total. En cambio, en el subgrupo de pacientes que habían fallecido, se encontró una significación estadística para la SG en función del polimorfismo TAP 2.2. Para este polimorfismo en concreto, aquellas pacientes portadoras del genotipo AG tuvieron una mediana de SG significativamente superior a las portadoras del genotipo AA, como puede observarse en la siguiente figura.

TABLA 63: SG en función del polimorfismo TAP2.2

TAP2.2	Genotipo	n Eventos	m SG (días)	p
	AA	11	558	0,008
	AG	3	1714	

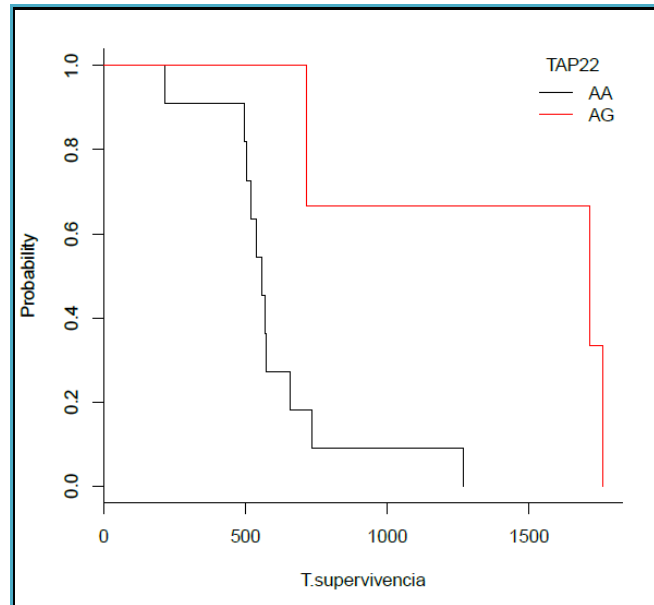


FIGURA 24: SG en función de los genotipos en el polimorfismo TAP 2.2 en el subgrupo de pacientes fallecidas.

7. Análisis biclustering de variables clínicas en pacientes con cáncer de mama y polimorfismos genéticos.

Se realizó un análisis biclustering teniendo en cuenta los polimorfismos genéticos analizadas anteriormente y tres variables clínicas que consideramos más relevantes para este estudio, las cuales fueron: antecedentes familiares (sí o no), recaída de la enfermedad (sí o no) y subtipo molecular (luminales frente al resto).

La comparación más significativa se encontró para la variable clínica subtipo molecular (luminales frente al resto) (Figura 27), donde se analizaron un total de más de 1700 clusters con un tamaño máximo para al menos uno de ellos de 15 pacientes. En concreto para este cluster, los genes que agrupaba fueron: NKG2D72A_GG, LMP7_CC, TAP1.1_AA, TAP1.2_AA y TAP2.2_AG, que como puede observarse son los que aparecen con más frecuencia en los más de 1700 clusters de pacientes que se obtienen en esta comparación.

A continuación se muestran las figuras obtenidas en nuestro análisis:

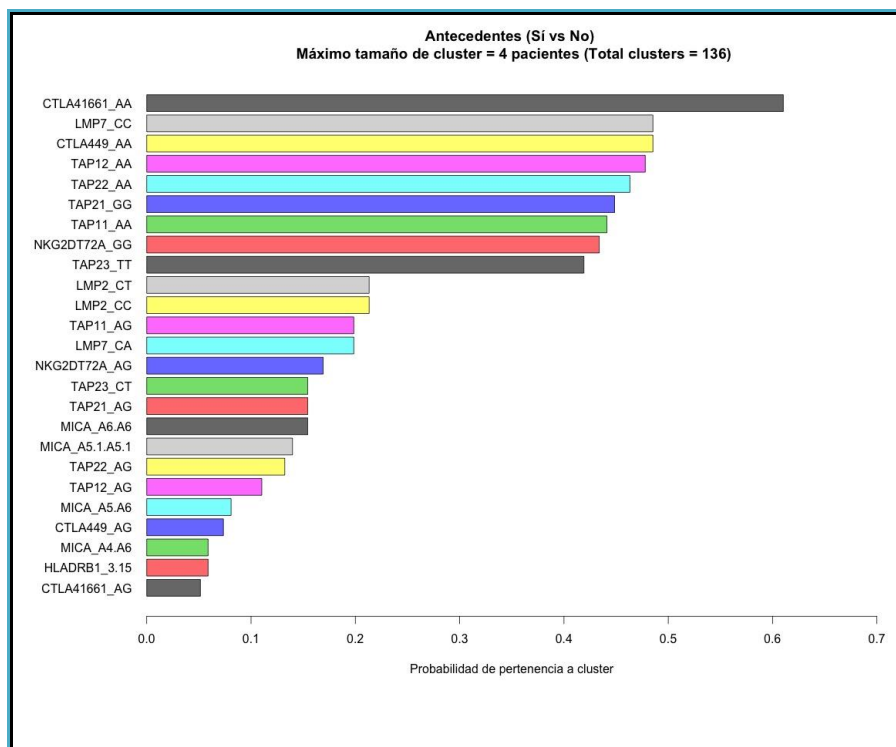


FIGURA 25: Análisis biclustering en función de la variable clínica antecedentes familiares.

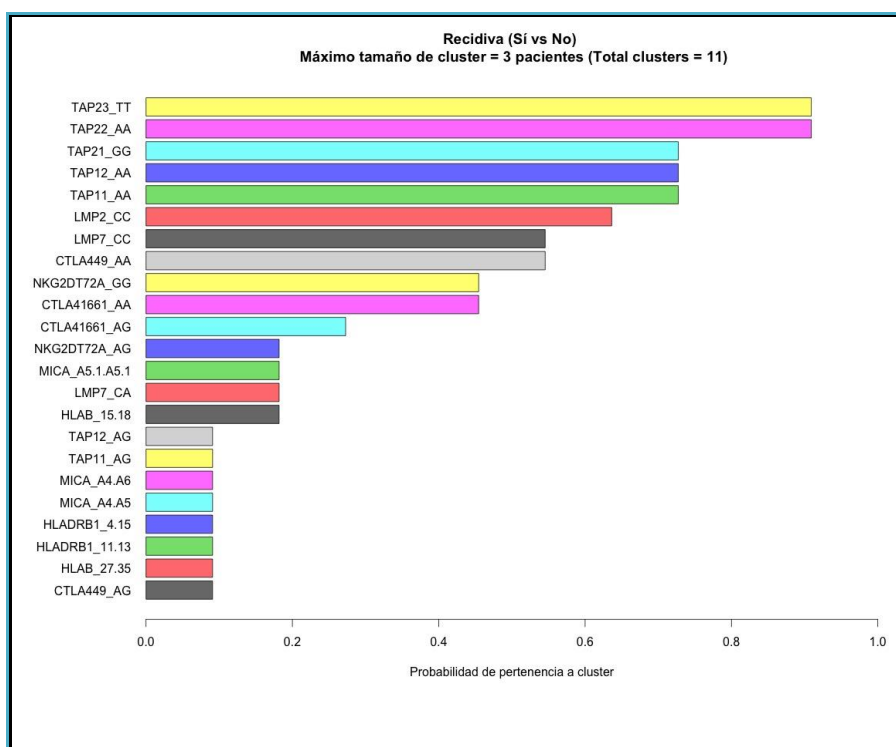


FIGURA 26: Análisis biclustering en función de la variable clínica recidiva de la enfermedad.

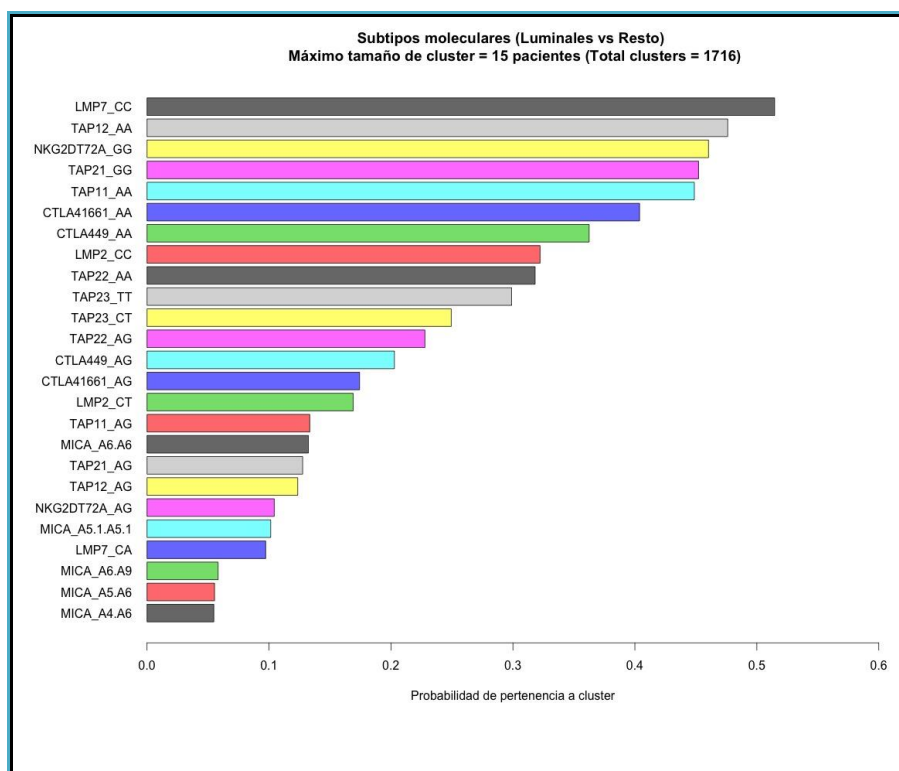


FIGURA 27: Análisis biclustering en función de la variable clínica subtipo molecular.

El siguiente paso que nos propusimos era saber si los perfiles genéticos identificados en cada cluster tenían alguna significación clínica y biológica. Para ello decidimos analizar si los tumores de las pacientes que pertenecían a cada cluster compartían similares características clínico-patológicas, así como su salida clínica. En este trabajo, debido a la limitación de tiempo no hemos podido incluir el análisis final, por lo que sólo analizamos el cluster con mayor número de pacientes (n= 15) encontrado en la comparación de la variable clínica subtipo molecular (luminales frente al resto). La siguiente tabla muestra las características clínico-patológicas analizadas de cada paciente y sus resultados.

TABLA 64: Características clínico-patológicas de las pacientes. NC: no conocido. †: fallecida.

	Edad	GH	N+	T	Recaída
CM-6	48	GH2	No	T1	No
CM-13	60	GH-1	No	T1	†
CM-48	45	GH-2	Sí	T2	No
CM-49	47	GH-2	Sí	T2	Sí
CM-60	48	GH-2	No	T2	No
CM-68	51	GH-2	No	T1	No
CM-72	62	GH-2	No	T1	No
CM-80	59	GH-2	Sí	T2	No
CM-82	62	NC	Sí	T3	No
CM-130	50	GH-1	No	T1	No
CM-132	42	GH-2	Sí	T1	No
CM-148	38	NC	Sí	T2	No
CM-182	64	GH-3	No	T2	No
CM-183	42	GH-3	No	T2	No
CM-188	48	GH-2	No	T2	No

Como hemos dicho anteriormente, estas pacientes eran todas portadoras de tumores luminales, y por lo tanto con expresión hormonal en mayor o menor medida. La mayoría de ellas (85,6%) tenían una edad ≥ 45 años y tumores de bajo grado histológico (GH1 o 2) (73,3%). El 53,3% de ellas no tenía afectación ganglionar al diagnóstico y el 66,6% tenían tumores > 2 cm. Sólo una paciente del cluster había recaído en el seguimiento de la enfermedad y una de ellas había fallecido, aunque por causa no relacionado con su cáncer de mama.

V.DISCUSION

La tumorigénesis es un proceso que involucra múltiples pasos, que a su vez producen cambios genéticos que finalmente conducen a la transformación progresiva de una célula normal en una célula neoplásica. Durante este proceso que da lugar al desarrollo de los tumores, cada cambio genético confiere algún tipo de ventaja adicional para el crecimiento y eventualmente el establecimiento de metástasis (Hanahan D y Weinberg RA, 2000).

Se ha sugerido que existen seis alteraciones esenciales en la fisiología de las células que colectivamente permiten la transformación celular. Estas alteraciones provocan:

- Autosuficiencia en la producción de factores de crecimiento.
- Pérdida de respuesta a señales inhibitorias del crecimiento celular.
- Evasión de o resistencia a la apoptosis.
- Adquisición de potencial replicativo ilimitado.
- Promoción de la angiogénesis sostenida.
- Invasión de tejidos (capacidad de metastatizar).

Se sabe que estas células, en su proceso de neotransformación expresan neoantígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune del organismo. A través del reconocimiento de estos antígenos tumorales, el sistema inmune es capaz de atacar a las células transformadas, destruyéndolas antes de que el tumor se forme como una masa celular de un tamaño detectable clínicamente. A pesar del rol del sistema inmune como efector de una respuesta inmune anti-tumoral, en muchos casos las células tumorales no son eliminadas de forma eficiente. Esto se debe a que los tumores han desarrollado una gran variedad de mecanismos de escape que les permite evadir la respuesta inmune del organismo.

Algunos autores consideran que no existe “escape” del tumor porque la respuesta inmune contra el tumor, al igual que contra los tejidos normales, se caracteriza por la ignorancia, tolerancia y supresión (Restifo NP et al., 2002). Sin embargo, existen evidencias que indican que el sistema inmune selecciona durante la formación del tumor, variantes que están mejor adaptadas para sobrevivir en un ambiente inmunológicamente intacto (Dunn GP et al., 2002), de una manera muy parecida a lo que hace con virus, bacterias y parásitos. Por ejemplo, los tumores que se forman en huéspedes inmunocompetentes son menos inmunogénicos que los tumores que se desarrollan en ausencia de un sistema inmune intacto. De esta manera en los tumores que se generan bajo la presión del sistema inmune, se seleccionan aquellas células más resistentes a los mecanismos efectores citotóxicos, produciendo variantes tumorales con inmunogenicidad reducida o que adquieran otros mecanismos que les permitan evadir o suprimir el ataque inmune, y que tienen más probabilidades de sobrevivir en el hospedador inmunocompetente (Shankaran V et al., 2001). Por lo tanto, se puede decir que el sistema inmune ejerce una doble acción, por una parte, protectora sobre el hospedador, y por otra, una acción modeladora sobre el tumor en desarrollo.

Por otro lado se sabe que el sistema inmune no es el mismo en todos los individuos, sino que entre unos y otros se encuentran variaciones en el repertorio de células efectoras y de moléculas implicadas en el reconocimiento antigénico. Por un lado, estas variaciones son producto de reordenamientos genéticos a nivel de las células linfoides que dan lugar al receptor clonotípico propio de estas células (TCR). Cada clon, a través de su TCR, reconoce específicamente una secuencia peptídica proveniente del procesamiento antigénico llevado a cabo en el interior de las células. En este caso, la célula tumoral procesaría péptidos característicos que funcionarían como antígenos tumorales, que al ser presentados unidos a las moléculas de HLA, deberían ser reconocidos por algunos de estos clones de linfocitos. Estas moléculas, codificadas por el MHC, se caracterizan por su alto grado de polimorfismo y son las responsables de proporcionar el contexto adecuado para el reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T, ejerciendo así un papel crucial en el desarrollo y control de la respuesta inmune.

Todas estas variaciones polimórficas, son funcionalmente aptas, por lo que no pueden considerarse mutaciones patogénicas, sino simplemente modificaciones que introducen la variabilidad necesaria, dotando así al organismo de la capacidad de detección de un amplio conjunto de patógenos, tejidos dañados o células transformadas y al mismo tiempo haciendo que cada individuo tenga un repertorio inmunológico propio y responda de forma única.

Sin embargo, se sabe que estas variaciones que dan lugar a polimorfismos funcionalmente aptos pueden afectar a la susceptibilidad frente a distintas enfermedades. Existen múltiples evidencias en la literatura de que la susceptibilidad genética al cáncer puede deberse, entre otras, a variaciones heredadas de los genes del MHC, así como de otras moléculas implicadas en el reconocimiento antigénico. Las variantes polimórficas de este sistema genético si bien no pueden considerarse de alta penetrancia respecto a su influencia en el cáncer, podrían englobarse dentro del grupo de genes de baja penetrancia, que actuando conjuntamente entre sí junto con factores ambientales, pueden afectar a la susceptibilidad o bien a la protección a padecer la enfermedad.

Los genes MHC son enormemente polimórficos, lo que significa que existen muchos alelos diferentes en los distintos individuos de la población. El polimorfismo es tan grande que en una población mixta (no endogámica) no existen individuos que tengan exactamente el mismo juego de genes y moléculas MHC, excepto los gemelos idénticos.

Las regiones polimórficas de cada alelo se encuentran en la zona de contacto con el péptido que va a presentar al linfocito. Por esta razón, la zona de contacto de cada alelo de molécula MHC es muy variable, ya que los residuos polimórficos del MHC forman hendiduras específicas en las que sólo pueden introducirse cierto tipo de residuo peptídico, lo cual impone un modo de unión muy preciso entre el péptido y la molécula MHC. La evolución del polimorfismo MHC asegura que una población será capaz de defenderse frente a la enorme diversidad de patógenos existentes, y que no sucumbirá ante la presencia de un nuevo

patógeno o un patógeno mutado, porque al menos algunos individuos serán capaces de desarrollar una respuesta inmune adecuada para vencer al patógeno. Las variaciones en las secuencias de MHC (responsables del polimorfismo) resultan de la herencia de diferentes moléculas MHC, y no son inducidas por recombinación, como ocurre con los receptores de antígenos.

La herencia de alelos específicas de HLA clase I y II pueden promover la generación de células T específicas para la eliminación de patógenos, además de correlacionarse con resistencia a tumores, particularmente aquellos ligados a etiología viral (Wank R et al., 1993; Apple RA et al., 1994; Nawa A et al., 1995). Por otra parte, en muchos tumores, las alteraciones somáticas pueden contribuir a la regulación a la baja de la expresión de genes HLA clase I en las células tumorales (Marincola FM et al., 2000). Estas alteraciones podrían contribuir potencialmente a la evasión inmune y podrían presentar un paso más en el proceso de tumorigénesis. Hay también evidencias de que los tumores de mama HLA clase I negativos tienen un potencial metastático y una agresividad clínica mayor (Concha A et al., 1991; Goepel JR et al., 1991). Si la inmunovigilancia es importante durante la tumorigénesis, ciertos individuos que porten determinados alelos podrían ser más susceptibles o resistentes a tipos específicos de cáncer.

La presentación de antígenos tumorales al sistema inmunológico tiene lugar a través del sistema HLA clase I. Los polimorfismos que dan lugar a los diferentes alelos de HLA se encuentran localizados fundamentalmente en la región que conforma el sitio de unión al péptido. Este hecho puede afectar a la afinidad del sitio de enlace por determinados antígenos en función del polimorfismo existente, lo que explicaría que algunos de los alelos pudieran encontrarse asociados a determinadas enfermedades. Actualmente se conocen cientos de enfermedades, la mayoría de ellas infecciosas o autoinmunes, asociadas con uno o más genes clásicos y no clásicos de la región MHC (Brewerton DA et al., 1973; Schlösstein L et al., 1973; Contu L et al., 1998; Ma JJ et al., 1998; Noble JA et al., 2008). Sin embargo, si nos referimos a la bibliografía, observamos que a lo largo de los años los estudios de frecuencias de moléculas HLA y cáncer realizados han arrojado resultados muy dispares, encontrándose que las asociaciones halladas varían a menudo en función del área geográfica donde se haya llevado a cabo el estudio. De este modo, podemos encontrar alelos que confieran susceptibilidad o una enfermedad en determinadas áreas, pero no en otras (Ghaderi M et al., 2000,2002; Dehaghani AS et al., 2002; Hamsiková E et al., 1999; Wu Y et al., 2007; Madeleine MM et al., 2002; de Jong MM et al., 2005; Chatzipetrou MA et al., 1999; Lee JE et al., 1996; Chaudhuri S et al., 2000; Subira ML et al., 1979; Lindenberg P et al., 1986; Gourley C et al., 2003).

Una de las posibles explicaciones a este fenómeno va ligada a la función primordial de las moléculas HLA, que es presentar a células del sistema inmunológico péptidos intracelulares o de antígenos exógenos, fundamentalmente procedentes de patógenos infecciosos. Esto ha tenido como consecuencia que este sistema molecular se haya visto sometido a una presión ambiental de selección, provocada por el conjunto de patógenos propios de la zona, que ha

desembocado finalmente en que puedan encontrarse variaciones significativas de las frecuencias de los diferentes alelos dependiendo del área geográfica.

En nuestro trabajo, al comparar las frecuencias de los alelos HLA en pacientes con CM y controles sanos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en tres alelos HLA (B15, B35 y B38). HLA-B15 se hayó incrementada en pacientes respecto a controles ($p=0,013$) y HLA-B35 y -B38 se encontraron aumentadas en controles respecto a pacientes ($p=0,022$ y $p=0,028$ respectivamente). Sin embargo, cuando se realizó la corrección por el número de alelos (test de Bonferroni) se perdió la significación estadística en los tres alelos. Si lo comparamos con lo publicado en la literatura, no se encontró diferencia en la frecuencia del alelo HLA-B7 entre pacientes y controles. Subira y colaboradores (1997) realizaron un estudio de frecuencias de HLA en 50 pacientes españolas con CM y controles sanos mediante métodos serológicos, encontrándose un aumento de la frecuencia del alelo HLA-B7 en pacientes. Posteriormente, el grupo de Lavado y colaboradores (2005) obtuvo el mismo resultado cuando comparó las frecuencias de los alelos HLA entre mujeres diagnosticadas de CM del Sur de España y controles sanos de la misma área geográfica, con la diferencia de la técnica utilizada, que es este caso se hizo mediante tecnología molecular (PCR-SSP) y con un tamaño muestral mayor, confiriendo al estudio un mayor poder estadístico. Estos datos sugieren que el alelo de clase I HLA-B7 pudiera estar relacionado con una susceptibilidad a padecer CM. En nuestro trabajo no hemos encontrado esta asociación entre HLA-B7 y un aumento del riesgo de padecer CM. Los motivos pueden ser múltiples. Aunque nuestro grupo de pacientes pertenece a la misma área geográfica que el de Lavado y colaboradores, en nuestro caso contábamos con un grupo de pacientes con antecedentes familiares (34%), pudiendo contribuir a las diferencias de los resultados. Por otra parte diferencias secundarias a la técnica de análisis de los alelos. Aunque en ambos trabajos se usaron técnicas moleculares, en nuestro trabajo, el análisis de los alelos HLA se realizó mediante PCR-SSO, una técnica de más alta resolución, mientras que en el grupo de Lavado mediante PCR-SSP.

Por otra parte, también se han llevado a cabo por otros grupos estudios de asociación en los que se han analizado frecuencias de HLA clase II en pacientes con CM. Como resultado de estos trabajos han sido sugeridos como protectores frente al CM los alelos HLA-DRB1* 1101 y DQB1* 03032 (Chaudhuri S et al., 2000). En nuestro trabajo sólo se analizó HLA-DRB1, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias entre pacientes con CM y controles sanos. Al igual que en el grupo de Lavado y colaboradores (2005), esta discrepancia en los resultados puede explicarse teniendo en cuenta que el grupo de pacientes utilizado por Chaudhuri y colaboradores está compuesto exclusivamente por mujeres diagnosticadas a edad temprana (early-onset), es decir, con menos de 40 años, en cuya categoría nosotros incluimos únicamente 29,5% de pacientes. Así mismo, aunque ambas poblaciones de estudio son caucasoides, pertenecen a áreas geográficas muy distintas, lo que podría influir en las frecuencias de los alelos obtenidas en los diferentes estudios.

Cuando la eliminación de células tumorales a través de mecanismos de citotoxicidad en los que interviene el MHC ha sido eludida, queda la vía de la respuesta citotóxica a través de las células NK.

El reconocimiento de las células tumorales por parte de la inmunidad innata utiliza receptores de la línea germinal no reordenados y por tanto carece del reconocimiento específico con restricción del MHC (Papazahariadou M et al., 2007; Sfondrini L et al., 2003). En el caso de las células NK, el reconocimiento está regulado por diferentes tipos de receptores. Por un lado están los receptores Kir (killer inhibition receptors), reconocen MHC clase I, por lo que las células NK son capaces de identificar a los tumores mamarios que pierdan moléculas MHC clase I durante la carcinogénesis (Moretta L et al., 1994; Moretta L et al., 2002; Stein MN et al., 2006). Otro receptor importante lo constituye NKG2D, que reconoce células transformadas. El daño del ADN celular en lesiones preneoplásicas o tumores invasivos es un factor que regula a los ligandos NKG2D, lo que explicaría que las células tumorales sean reconocidas por el sistema inmune innato, y como consecuencia, antiven la respuesta adaptativa. NKG2D es un receptor activador expresado en células T CD8+, células T $\gamma\delta$ y células NK. En las células T, NKG2D actúa como receptor co-estimulador, mientras que en las células NK éste puede inducir directamente citotoxicidad. Como NKG2D no tiene dominio intracelular, la molécula adaptadora DAP10 es esencial para la señalización. La unión del ligando con el receptor NKG2D permite la fosforilación del dominio citoplasmático de DAP10, promoviendo la activación de la vía PI3K/GrB-2, y a su vez activación de MEK y ERK. Se sabe de la existencia de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (rs2255336 G->A) en la región transmembrana de NKG2D, el cual se caracteriza por la sustitución de una alanina por treonina, dando lugar al cambio de nucleósido guanina por adenosina. Este es el único SNP conocido que se encuentra en la región transmembrana del receptor, cerca del sitio de unión de la proteína adaptadora DAP10 y se ha visto que puede estar asociado con disminución de la función de las células NK y células T (Kabalak G et al., 2010; Hayashi T et al., 2006).

En la literatura podemos observar la implicación de este polimorfismo con neoplasias y enfermedades autoinmunes. Así por ejemplo, se ha visto que mujeres con cáncer de cérvix y que son portadoras de la variante génica NKG2D 72Thr podrían estar protegidas frente a la progresión de la enfermedad a estadios más avanzados (Roszak A et al., 2012). Igualmente, esta variante génica podría proteger también frente a la incidencia del lupus eritematoso sistémico (LES) (Piotrowski P et al., 2012). Por último, en un trabajo realizado sobre población alemana y española se vio que el genotipo GG de NKG2DThr72Ala se asoció de forma estadísticamente significativo con el desarrollo de LES en la cohorte alemana y con una tendencia a la significación en la cohorte española (Kabalak G et al. 2010). En nuestro trabajo se genotipó este punto polimórfico de NKG2DThr72Ala en pacientes con CM y controles sanos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las frecuencias de genotipos y alelos entre los dos grupos.

La activación de las células NK se produce mediante el reconocimiento de los antígenos MIC expresados en la superficie de las células tumorales (Moretta A et al., 2001). NK es fundamental, ya que reconoce antígenos que frecuentemente se sobreexpresan en la mayoría de los tumores como es el caso de MICA, lo que indica un papel importante de este sistema en la inmunovigilancia del cáncer.

Por lo tanto, decidimos llevar a cabo un estudio del gen MICA. En concreto se analizaron las frecuencias de los alelos dados por diferentes repeticiones GCT en el exon 5 de la región transmembrana del gen MICA en pacientes con CM y controles sanos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles en los alelos de MICA analizados (A4, A5, A5.1, A6 y A9). Si revisamos lo existente en la literatura, en el grupo de Lavado y colaboradores referenciado anteriormente, se hayó que el alelo A5 se encontraba en menor frecuencia en pacientes que en controles, sugiriendo que podría estar asociado con protección frente a la enfermedad. Igualmente se confirmó una frecuencia significativamente menor del alelo MICA-A5 en pacientes HLA-B7 respecto a controles HLA-B7, aunque esa diferencia no se mantuvo al comparar pacientes HLA-B7 frente al resto de los pacientes. Por otra parte, en el mismo grupo se mostró una fuerte asociación del alelo A5.1 con susceptibilidad a la enfermedad en el grupo de portadores de HLA-B7, pero no en pacientes totales. MICA-A5.1 también ha sido sugerido como marcador genético en diversas enfermedades autoinmunes y otros tumores (Lopez-Vazquez A et al., 2002; Cheng L et al., 2000; Tamaki S et al., 2007). Da lugar a una forma truncada de la proteína, carente de cola citoplasmática que ha perdido su capacidad para permanecer enlazada en la membrana celular y que resulta en una forma soluble de la misma (Zwirner NW et al., 2006). Estas proteínas MICA solubles (sMICA) secretadas podrían facilitar la evasión del tumor a la inmunovigilancia mediante un mecanismo de bloqueo del receptor NKG2D, que obstaculizaría la unión de éste a las proteínas MICA ancladas en la membrana de las células NK, impidiendo la estimulación y la activación de las mismas, y por tanto, la respuesta citolítica frente a células tumorales (Raulet DH, 2003; Bauer S et al., 1999).

En la siguiente fase de nuestro trabajo, decidimos ampliar nuestro estudio a otro grupo de genes también involucrados en la respuesta inmune, y por lo tanto esenciales en la defensa antitumoral del huésped. Así pues, analizamos LMP, TAP y CTLA-4.

LMP y TAP son dos grupos de proteínas que participan en el procesamiento antigénico, jugano por tanto, un papel muy importante en el sistema inmune del huésped. Por una parte, LMP2 y LMP7 son proteínas con actividad catalítica inducidas en los proteosomas de células activadas por el INF γ , encargadas de la generación de péptidos endógenos, que una vez transportados al interior del retículo endoplásmico se unirán con moléculas MHC de clase I. Mientras que TAP, es una proteína heterodímera (formada por dos subunidades TAP1 y TAP2) y perteneciente a la superfamilia de transportadores ABC, encargada de transportar dichos péptidos endógenos desde el citosol hasta el interior del retículo endoplásmico. Actualmente se sabe que estos genes son enormemente polimórficos y estas variaciones genéticas se han

relacionado con enfermedades inflamatorias/autoinmunes (Krämer U et al., 2007; Dong Jun D et al., 1997; Deug GY et al., 1995), infecciosas (Huang P et al., 2014; Cui Q et al., 2010) y con el riesgo de determinadas neoplasias (Fellerhoff B et al., 2011,2015; Zou N et al., 2015), sin embargo, no se ha estudiado su posible implicación con el cáncer de mama.

En nuestro trabajo se estudiaron dos polimorfismos en los genes LMP2 (rs17587) y LMP7 (rs2071543), descritos previamente en la literatura por su asociación con enfermedades inflamatorias, infecciosas y algunas neoplasias. El análisis de la distribución de las frecuencias de genotipos y alelos en pacientes y controles no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, sí pudo observarse una tendencia hacia la significación cuando se comparó la frecuencia del genotipo TT de polimorfismo LMP2 (rs17587) entre los dos grupos, siendo más frecuente en pacientes que en controles ($p=0,065$). Si revisamos la literatura, en un estudio realizado en neoplasias hematológicas (Ozbas-Gerceker F et al., 2013), el polimorfismo LMP2 (rs17587) se encontró asociado con susceptibilidad de desarrollar leucemia mieloide aguda (LMA), siendo el genotipo TT más frecuente en LMA que en controles, cuando se comparaba con el resto de los genotipos. Del mismo modo, el alelo T resultaba ser más frecuente en casos (LMA) cuando se comparaba con controles sanos. En otro estudio realizado sobre cáncer gástrico (CG) (Ma X et al., 2015), donde también se analizaron los mismos polimorfismos que en nuestro trabajo, no se encontró asociación significativa entre el polimorfismo LMP2 (rs17587) y el riesgo de CG. Sin embargo, los resultados sí mostraron que el polimorfismo LMP7 (rs2071543) (genotipos Gln/Lys y Lys/Lys) contribuía a aumentar la susceptibilidad al CG, siendo el alelo Lys un factor de riesgo independiente para el desarrollo del mismo. No existen hasta la fecha, estudios que hayan relacionado estos polimorfismos con la susceptibilidad al CM, sin embargo los resultados obtenidos en nuestro trabajo se asemeja a lo que muestra la literatura con respecto a otras neoplasias. Sí es cierto que no se llega a alcanzar la significación estadística, pero si llegásemos a aumentar el número de pacientes estudiadas, podríamos alcanzar dicha significación. Polimorfismos en estos genes podrían modificar la especificidad del sustrato y la actividad proteolítica de los inmunoproteosomas, influyendo por lo tanto en la generación de péptidos y en su transporte hacia el retículo endoplásmico, y consecuentemente podríamos encontrar diferentes tipos de péptidos, generados por el mismo antígeno, siendo presentados a linfocitos T, en diferentes individuos, dando lugar, por tanto a respuestas inmunes totalmente distintas.

En cuanto a TAP, sólo se encontró diferencias estadísticamente significativas para el polimorfismo de TAP 2.1 (rs1800454). En concreto, se objetivó que el genotipo GG resultó ser más frecuente en controles respecto a casos ($p=0,008$), mientras que los genotipos AG y AA más frecuentes en pacientes que en controles ($p=0,043$ y $p=0,033$ respectivamente), sugiriendo así que los genotipos AG y AA pudieran estar relacionados con susceptibilidad de desarrollar CM. Variaciones en estos genes podrían dar lugar a cambios estructurales que impidieran la formación del heterodímero entre las proteínas TAP1-TAP2 y por lo tanto alterar el procesamiento antigénico, dando lugar a fallo en la presentación antigénica ya sea por expresión deficiente o falta de expresión de las moléculas de MHC-I en la superficie de las

células, no desencadenándose por lo tanto la respuesta inmune antitumoral. Si hacemos un repaso de la literatura, existen evidencias científicas de la asociación de estos genes con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, infecciosas y neoplásicas. Así por ejemplo, en un metaanálisis (Dai D et al., 2014) sobre estudios donde se analizaban la asociación de tres polimorfismos de TAP 2 (TAP 2-379 (rs1800454), TAP 2-565 y TAP 2-665) con la artritis reumatoide (AR), se objetivó una asociación estadísticamente significativa entre TAP 2-379 Ile con el incremento del riesgo de padecer AR. En el análisis por subgrupos, esta asociación sólo se mantenía para la población asiática y no para la europea. En otro estudio realizado en población asiática (Cao B et al., 2005), se analizaron polimorfismos en LMP7 y TAP2 e infección por el virus del papiloma humano (HPV) en pacientes con cáncer de esófago. Los resultados evidenciaron que la infección por HPV (serotipos 16 y 18) incrementaba de manera significativa el riesgo de desarrollar cáncer de esófago en esa área geográfica. El análisis de los polimorfismos estudiados, reveló que para el polimorfismo TAP 2.1 (rs1800454), los genotipos AG y AA fueron significativamente más frecuentes en casos que en controles, sugiriendo por tanto una relación con el aumento de susceptibilidad de padecer cáncer de esófago. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, siendo hasta la presente el único donde se ha encontrado una relación de TAP 2.1 (rs1800454) con la susceptibilidad de padecer CM.

Por otra parte, en nuestro trabajo se seleccionó para su estudio el haplotipo LMP7/TAP 2.1 que contenía los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) rs 2071543 (de LMP7) y rs 1800454 (de TAP 2.1), cuya relación con el riesgo de neoplasias ya se había estudiado en otras publicaciones. Se construyeron un total de 4 haplotipos (A, B, C y D). El haplotipo D no estuvo representado en ninguno de los dos grupos estudiados de nuestra población. El haplotipo C resultó ser más frecuente en pacientes con cáncer de mama (CM) cuando se comparó con el grupo control, de forma estadísticamente significativa ($p=0,009$). Si lo comparamos con lo publicado en la literatura, nuestros resultados fueron muy similares a los obtenidos en el grupo de Cao B y colaboradores (Cao B et al., 2005), referenciado anteriormente. Los haplotipos A, B y C fueron los más frecuentes en los dos grupos analizados (pacientes con cáncer de esófago y controles), representando un 96% del total. Sólo el haplotipo C se asoció con el aumento de riesgo de desarrollar cáncer de esófago. Igualmente, en presencia de infección por el HPV, el haplotipo C se asociaba con un aumento del riesgo de cáncer de esófago cuando se comparaba con los portadores del haplotipo C y no infección por el HPV o con aquellos con infección por el HPV pero no portadores del haplotipo C.

El último gen que estudiamos fue CTLA-4. Se trata de un receptor de membrana con acción inhibitoria que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que se expresa en la superficie de los linfocitos T en reposo en niveles muy bajos. Solo a medida que el linfocito T se activa, los niveles de CTLA-4 en la superficie celular se van elevando. Se trata de un gen muy polimórfico. Se han identificado más de 100 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) (Ueda H et al., 2013; Ligers A et al., 2001) y muchos de ellos se han estudiado por su implicación con el riesgo de cáncer así como enfermedades autoinmunes.

En nuestro trabajo se analizaron dos polimorfismos de CTLA-4: +49 A/G, localizado en el exón 1 del gen, y -1661 A/G, localizado en el promotor, ambos ampliamente estudiados en la literatura. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias de genotipos y alelos entre pacientes con CM y controles para el polimorfismo CTLA-4 +49 A/G. En cambio para el polimorfismo CTLA-4 -1661 A/G se objetivó que el genotipo GG fue significativamente más frecuente en el grupo control que en pacientes ($p=0,012$), sugiriendo un posible factor protector para el desarrollo de la enfermedad. Si revisamos lo publicado en la literatura, los resultados sobre CTLA-4 y su asociación con el riesgo de cáncer son contradictorios, y varían según la región geográfica y el tipo de cáncer analizado. Así por ejemplo, en relación con el CM, es un estudio realizado en población china (Wang L et al., 2007) se observó que para el polimorfismo CTLA-4 -1661 A/G, la frecuencia del genotipo AA fue significativamente más baja en pacientes que en controles. En otro estudio realizado en población iraní y CM (Erfani N et al., 2006), se analizaron tres polimorfismos localizados en la región del promotor del gen (-722 T/C, -1661 A/G y -318 C/T), no encontrándose diferencias significativas en la distribución de frecuencias de genotipos y alelos cuando se comparaban pacientes con controles. En cambio, cuando se realizaba análisis por subgrupos en función con factores pronósticos y predictivos del CM, se vio que el genotipo AA de -1661 se asoció con menor afectación linfática de la enfermedad, tumores con mayor expresión de receptores de estrógenos, pudiendo sugerir estos resultados que este polimorfismo en el promotor del gen podría participar más en la progresión del CM que en su desarrollo inicial. En relación con otros tipos de cánceres, sucede lo mismo. Para cáncer gástrico (CG), en un estudio realizado sobre población asiática (Hou R et al., 2010), se analizaron varios polimorfismos de CTLA-4 (+49 A/G, -1661 A/G y -1772 T/C). Los resultados mostraron que la frecuencias del genotipo AG de +49 A/G y del genotipo GG de -1661 A/G fueron significativamente mayores en pacientes que en controles, no encontrándose diferencias en las frecuencias de genotipos y alelos para -1772 T/C entre pacientes y controles. Por último, un meta-análisis que englobaba 31 estudios casos-control donde se analizaban dos polimorfismos de CTLA-4 (60 G/A y -1661 A/G) en diferentes tipos de cánceres, mostró que para el polimorfismo CTLA-4 -1661 A/G, los genotipos AG (vs AA) y AG+GG (vs AA) se asociaron con un aumento del riesgo de cáncer. Cuando se realizaba un análisis por subgrupos según el tipo de cáncer, se seguía manteniendo la asociación significativa para CG y CM.

Todos estos estudios, con resultados contradictorios según el tipo de cáncer y la región geográfica analizada, nos hacen pensar como posible explicación en el gran polimorfismo de este receptor. Se sabe, por ejemplo, que los polimorfismos localizados en la zona del promotor del gen (como -722 T/C, -1661 A/G y -318 T/C, entre otros), que es el lugar de unión de los factores de transcripción, podrían modular la acción de éstos, y por lo tanto variar el nivel de expresión de gen (Ernani N et al., 2006). Por otra parte, también se ha sugerido que polimorfismos en este gen, durante etapas tempranas de la tumorigénesis, podrían elevar el umbral de activación de las células T, atenuando la respuesta antitumoral e incrementando por lo tanto la susceptibilidad al cáncer (Liu J et al., 2013).

Dado los resultados obtenidos en el análisis de los genes seleccionados, quisimos hacer un modelo de regresión logística multivariante para predecir “caso” en función de las variables genéticas. Para ello elegimos aquellas variables genéticas que habían salido estadísticamente significativas en el análisis univariante, como fueron CTLA-4 -1661, TAP 2.1, y además LMP2 por sus resultados cercanos a la significación. El modelo mostró significación estadística solo para CTLA-4 -1661 y TAP 2.1. Los resultados pusieron de manifiesto que para el genotipo GG del polimorfismo CTLA-4 -1661, se obtenía una odd ratio (OR) de 0,11 (IC: 0,006-0,689), sugiriendo su implicación como factor protector para el desarrollo de CM. Por otra parte, para el genotipo AG de TAP 2.1, la OR fue de 1,72 (IC: 1,004-2,901), sugiriendo asociación como factor de riesgo o susceptibilidad para padecer CM. Estos resultados confirman los obtenidos en el análisis univariante, reforzando la implicación de estos genes en el CM en nuestro estudio.

Otro punto que realizamos en nuestro trabajo, fue un análisis comparativo de cada uno de los polimorfismos genéticos estudiados (con la excepción de HLA y MICA) en función de una serie de variables clínicas seleccionadas (ver apartado IV. 5) relacionadas con la enfermedad. Los resultados obtenidos encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos estudiados cuando se analizaron según las variables clínicas solo en tres de ellas: estado hormonal al diagnóstico, estadio patológico de la enfermedad y subtipo molecular. En cuanto a la variable estado hormonal al diagnóstico, la diferencia significativa se encontró para el polimorfismo TAP 1.1 y el subgrupo de mujeres premenopáusicas ($p=0,05$), donde se veía que el genotipo AA aumentaba de forma importante (hasta un 81%) con respecto a los otros subgrupos. Y para TAP 2.1 y el subgrupo de mujeres perimenopáusicas ($p=0,03$), donde el genotipo AA también aumentaba de una manera significativa en comparación de los demás subgrupos. En cuanto a la variable estadio patológico de la enfermedad, la diferencia estadísticamente significativa se encontró para el polimorfismo LMP7 y los subgrupos estadio O (Tis) y estadio IIIB, donde aumentaba de forma considerable el genotipo AA con respecto a otros subgrupos. Para la variable subtipo molecular, los polimorfismos donde se encontraron significación estadística fueron CTLA-4 + 45A/G y los subgrupos triple negativo y luminal B-Her 2+, donde el genotipo más frecuente encontrado fue el AG y TAP 2.3 y el subgrupo luminal B/Her 2+ donde el genotipo más frecuente fue el CT. Realizar una traducción clínica de estos resultados es muy difícil, y por lo tanto tenemos que analizarlos con precaución. El número de pacientes, en algunos subgrupos clínicos es muy pequeño, dado el tamaño de nuestra muestra de mujeres con cáncer de mama ($n=200$), y por lo tanto podría distorsionar algunos resultados. Por otro lado, existen muy pocos estudios clínicos donde se analicen polimorfismos en estos genes en neoplasias y los resultados se comparen en función de variables clínicas de la enfermedad. Sólo en un estudio realizado también en CM (Erfani N et al., 2006), se asoció el genotipo AA de polimorfismo en CTLA-4 -1661 con una menor afectación linfática de la enfermedad y mayor expresión de receptores de estrógenos, por lo que existen pocos datos para comparar en la bibliografía. No cabe duda, que una vez desarrollado el CM, los diferentes polimorfismos en estos genes en interacción con

características moleculares y clínicas de la enfermedad, participarían en la progresión y evolución del CM.

En adición, realizamos en nuestro trabajo un estudio de los parámetros de eficacia del tratamiento (SG y SLE) en función de cada uno de los polimorfismos genéticos (excepto HLA y MICA) y las variables clínicas estadio patológico de la enfermedad y subtipo molecular. Únicamente se encontró diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron ambos parámetros de eficacia en función de las variables genéticas y clínicas para la SG y TAP 2.2. Para este polimorfismo en concreto, las portadoras del genotipo AG tuvieron una mediana de SG significativamente superior que las portadoras del genotipo AA (ver figura 24). Este dato nos hace pensar igualmente, que los polimorfismos en estos genes no sólo estarían implicados en la susceptibilidad o no del desarrollo del CM, también en su progresión y evolución clínica.

Por último, el análisis biclustering llevado a cabo teniendo en cuenta los polimorfismos genéticos estudiados anteriormente y las variables clínicas antecedentes familiares (sí o no), recaída de la enfermedad (sí o no) y subtipo molecular (luminales frente al resto) puso de manifiesto un conjunto de clusters, es decir grupos de pacientes con CM que expresaban de manera simultánea determinados polimorfismos genéticos. La comparación más significativa se encontró para la variable clínica subtipo molecular (luminales frente al resto), identificándose más de 1700 clusters o grupos, con un tamaño máximo para uno de ellos de 15 pacientes, cuyos genes expresados fueron: NKG2DA_GG, LMP7_CC, TAP1.1_AA, TAP1.2_AA, TAP2.2_AG. Los genotipos que formaban este “perfil” son los que aparecían con más frecuencia en los más de 1700 clusters de pacientes que se obtuvieron en esta comparación. Este resultado parece bastante relevante porque demuestra una asociación fuerte para estos polimorfismos genéticos para determinar subpoblaciones entre los tumores luminales. Sin embargo, el número de grupos bajaba cuando se comparaban las variables clínicas antecedentes familiares (136 clusters) y recidiva de la enfermedad (11 clusters), así como el tamaño máximo del cluster (4 y 3 pacientes respectivamente). No obstante consideramos también importantes estos resultados, a pesar de su tamaño, ya que nuestro objetivo sería “identificar grupos de pacientes” cuya expresión de determinados polimorfismos genéticos pudiera estar relacionada con el desarrollo y/o evolución de la enfermedad.

Con respecto si los correspondientes modelos genéticos identificados en cada cluster podían tener una significación clínica y biológica, decidimos analizar si los tumores de las pacientes pertenecientes a cada cluster tenían características clínico-patológicas similares, así como su salida clínica. El análisis del cluster con mayor número de pacientes (n= 15) encontrado en la comparación de la variable clínica subtipo molecular (luminales frente al resto) incluido en este trabajo, reveló un grupo de pacientes con una edad al diagnóstico ≥ 45 años, con tumores de bajo grado y tamaño > 2 cm en la mayoría de ellas, así como un buen pronóstico. Sí es cierto que el tamaño del cluster es muy pequeño, y que el no disponer de los resultados del análisis del resto de los clusters, limita el poder obtener conclusiones de estos resultados, pero no cabe duda que el análisis biclustering permitiría identificar “perfiles de

expresión génica” que determinarían subpoblaciones dentro de las pacientes con CM con una probable explicación clínico-patológica de la enfermedad.

Si hacemos un repaso de lo existente en la literatura, la mayoría de los estudios que han hecho posible la clasificación molecular del cáncer de mama han usado técnicas de clustering (Liu W et al., 2009; Krushevskaya D et al., 2009; Madeira SC et al., 2004; Tanay A et al., 2002; Furlan D et al., 2011), sin embargo la primera referencia en el análisis biclustering para identificar modelos de expresión génica para clasificar el CM es relativamente reciente de la mano del grupo de Wang y colaboradores (2013). En este trabajo se analizaron 7756 genes en 437 tumores de mama (cuyas pacientes no habían recibido tratamiento complementario), teniendo en cuenta las siguientes variables clínicas de la enfermedad: afectación linfática, estado del receptor de estrógenos, estado del receptor de progesterona, grado histológico, subtipo molecular, tamaño tumoral y edad de la paciente. Se obtuvo un total de 44 clusters con un tamaño máximo de 20 tumores. En este trabajo, al igual que en nuestro, los autores estudiaron si los tumores pertenecientes al mismo cluster compartían similares características clínico-patológicas, así como salida clínica, para determinar si los subgrupos tumorales y los correspondientes modelos genéticos identificados en el biclustering tenían significación clínica y biológica. Los resultados confirmaron dicha idea. Del mismo modo, los autores demostraron que los tumores incluidos en los clusters eran molecularmente diferentes, y que los clusters mostraban una fuerte asociación pronóstica con la supervivencia de las pacientes en relación con los marcadores clínicos convencionales.

En resumen, los resultados obtenidos en nuestro trabajo, sugieren que el genotipo AG del polimorfismo en TAP 2.1 (rs1800454) podría conferir susceptibilidad a padecer CM en nuestras pacientes. Así mismo, podemos sugerir que el genotipo GG de CTLA-4 -1661 parece conferir protección frente al desarrollo de la enfermedad, y que el haplotipo C de LMP7/TAP2.1 parece incrementar la susceptibilidad a padecer CM en nuestra área geográfica. Por otra parte, el análisis biclustering puso de manifiesto un conjunto de clusters en función de unas variables clínicas establecidas, con determinados perfiles de expresión génica, sugiriendo por tanto la existencia de subgrupos de tumores que pudieran tener una implicación clínica y biológica deferente. Sería interesante confirmar nuestros resultados en un estudio caso-control con un mayor número de pacientes, donde pudiéramos analizar con una mayor potencia también la implicación de los polimorfismos genéticos en función de variables clínicas de la enfermedad, así como profundizar en el análisis de cluster, con un estudio supervisado de los mismos, que nos permitiera definir con mayor exactitud los perfiles concretos implicados y su significado biológico. Además, sería aconsejable realizar un estudio de expresión de RNA para cada uno de los polimorfismos genéticos analizados y ver su correlación con los resultados obtenidos de la comparación de distribución de las frecuencias entre pacientes con CM y controles, así como comparar con variables clínicas de la enfermedad. Del mismo modo, dado el tipo de tumor que hemos estudiado, necesitamos un tiempo mayor de seguimiento para poder llegar a conclusiones más robustas en relación con el análisis de parámetros de eficacia de tratamiento (SG y SLE) y polimorfismo genéticos.

VI. CONCLUSIONES

1. El genotipo AG del polimorfismo de TAP 2.1 (rs1800454) fue más frecuente en pacientes que en controles, alcanzando diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que esta variante genética pueda estar asociada con susceptibilidad a padecer cáncer de mama en nuestra área geográfica.
2. El haplotipo C de LMP7 (rs2071543)/TAP 2.1 (rs1800454) resultó ser más frecuente en pacientes con cáncer de mama cuando se comparó con el grupo control, sugiriendo también una susceptibilidad para el desarrollo de esta enfermedad.
3. El genotipo GG del polimorfismo CTLA-4-1661 A/G fue significativamente más frecuente en el grupo control que en pacientes, lo que indica que este polimorfismo pueda estar asociado con protección frente al cáncer de mama en nuestra área geográfica.
4. Las variantes polimórficas de los demás genes estudiados (HLA, MICA, LMP, TAP y NKG2D) no parecen conferir susceptibilidad o protección frente al cáncer de mama en nuestras pacientes.
5. El análisis biclustering realizado de los diferentes polimorfismos genéticos estudiados, teniendo en cuenta las variables clínicas antecedentes familiares, recidiva de la enfermedad y subtipo molecular, pone de manifiesto la existencia de un conjunto de clusters o grupos de pacientes que comparten similares perfiles de expresión génica, pudiendo esto tener relevancia en el desarrollo y/o evolución del cáncer de mama.

VII. ABREVIATURAS

Aa: Aminoácido.
 Ac: Anticuerpo.
 ADN: Ácido desoxiribunucleico.
 Ag: Antígeno.
 APC: Célula presentadora de antígeno.
 AR: Artritis reumatoide.
 ARN: Ácido ribonucleico.
 CD: Células dendríticas.
 CDI: Carcinoma ductal infiltrante.
 CG: Cáncer gástrico.
 CIN: Inestabilidad cromosómica.
 CLI: Carcinoma lobulillar infiltrante.
 CM: Cáncer de mama.
 CMV: Citomegalovirus.
 GM-CSF: Factor estimulante del crecimiento de macrófagos.
 HLA: Antígeno leucocitario humano.
 IL: Interleuquina.
 IMC: Índice de masa corporal.
 INF: Interferón.
 Kb: Kilobase.
 KDa: Kilodalton.
 LCR: Líquido cefalorraquídeo.
 LMA: Leucemia mieloide aguda.
 LTc: Linfocito T citotóxico.
 MCA: Metilcolantreno.
 MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
 MIN: Inestabilidad de microsatélites.
 NIN: Inestabilidad de nucleótidos.
 NK: Natural killer.
 NKG2D-L: Ligandos de NKG2D.
 Nt: Nucleótido.
 Pb: Pares de bases.
 PND: Síndrome neurológico paraneoplásico.
 RE: Receptor de estrógenos.
 RH: Receptor hormonal.
 RP: Receptor de progesterona.
 Rpm: Revoluciones por minuto.
 SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.
 SNP: Polimorfismo de nucleótido simple.
 sMICA: MICA soluble.
 TCR: Receptor de células T.
 TGF β : Factor de crecimiento tumoral β .

TIL: Linfocito del infiltrado tumoral.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AB, Lichtman AH. "Ch.3 antigen capture and presentation to lymphocytes". Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system (3rd edition). Saunders (Elsevier). 2009; ISBN 978-1-4160-4688-2.
- Albert ML, Darnell RB. Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity. Nat Rev Cancer. 2004; 4 (1): 36-44.
- Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat Rev Immunol. 2001; 1 (3): 220-228.
- Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Cancer Immunol Immunother. 2004; 53 (10): 904-910.
- André P, Castriconi R, Espéli M, Anfossi N, Juárez T, Sue S, Conway H, Romagné F, Dondero A, Nanni M, Caillat-Zucman S, Raulet DH, Bottino C, Vivier E, Moretta A, Paul P. Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors. Eur J Immunol. 2004; 34 (4): 961-971.
- Androlewicz MJ, Cresswell P. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. Immunity. 1994; 1 (1): 7-14.
- Apple RA, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. Nat Genet. 1994; 6: 157-162.
- Appleman LJ, Berozovskaya A, Grass I, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. J Immunol. 2000; 164 (1): 144-151.
- Ascunce N, Delfrade J, Salas D, Zubizarreta R, Ederra M; en nombre de Red de Programas de Cribado de Cáncer. Breast cancer screening: characteristics and results of the Spanish programs. Med Clin (Barc). 2013. 141 (1): 13-23.
- Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Restifo NP, Haworth LR, Levy C, Mavroukakis SA, Nichol G, Yellin MJ, Rosenberg SA. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. J Clin Oncol. 2005; 23 (25): 6043-6053.
- Awata T, Kurihara S, Litaka M, Takei S, Inoue I, Ishii C, Negishi K, Izumida T, Yoshida Y, Hagura R, Kuzuya N, Kanazawa Y, Katayama S. Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Grave's disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. Diabetes. 1998; 47 (1): 128-129.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91 (14): 6259-6263.
- Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Immunol Rev. 1991; 124: 5-24.
- Barclay AN. Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96 (26): 14672-14674.
- Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, Martins B, Andreia R, Viana JF, Crespo F, Vasconcelos C, Ferreira C, Vicente AM. Evidence for CTLA4 as a

- susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12 (8): 620-626.
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006; 24 (34): 5373-5380.
 - Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells by NKG2D, a receptor for stress- inducible MICA. *Science*. 1999; 285 (5428): 727-729.
 - Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*. 1998; 92 (3): 367-380.
 - Belich MP, Glynn RJ, Senger G, Sheer D, Trowsdale J. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol*. 1994; 4 (9): 769-776.
 - Benacerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*. 1972; 175 (4019): 273-279.
 - Bianchini G, Qi Y, Alvarez RH, Iwamoto T, Coutant C, Ibrahim NK, Valero V, Cristofanilli M, Green MC, Radvanyi L, Hatzis C, Hortobagyi GN, Andre F, Gianni L, Symmans WF, Pusztai L. Molecular anatomy of breast cancer stroma and its prognostic value in estrogen receptor-positive and –negative cancers. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (28): 4316-4323.
 - Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. *Nat Immunol*. 2003; 4 (6): 557-564.
 - Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (5): 373-382.
 - Breuning MH, van den Berg-Loonen EM, Bernini LF, Bijlsma JB, van Loghem E, Meera Khan P, Nijenhuis LE. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. *Hum Genet*. 1977; 37 (2): 131-139.
 - Bradshaw JD, Lu P, Leytze G, Rodgers J, Schieven GL, Bennett KL, Linsley PS, Kurtz SE. Interaction of the cytoplasmic tail of CTLA-4 (CD152) with a clathrin-associated protein is negatively regulated by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry*. 1997; 36 (50): 15975-15982.
 - Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet*. 1973; 1 (7809): 904-907.
 - Bromberg JF, Horvath CM, Wez Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (15): 7673-7678.
 - Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes. Implications for divergent function among distinct proteasome subsets. *J Immunol*. 1993; 151 (3): 1193-1204.
 - Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*. 1987; 328 (6127): 267-270.
 - Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol*. 1999; 162 (10): 5813-5820.

- Brutkiewicz RR, Bennink JR, Yewdell JW, Bedelac A. TAP-independent, beta 2-microglobulin-dependent surface expression of functional mouse CD1.1. *J Exp Med*. 1995; 182 (6): 1913-1919.
- Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 2006; 107 (1): 159-166.
- Burnet FM. Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br Med Bull*. 1964; 20: 154-158.
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970; 13: 1-27.
- Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev*. 1971; 7: 3-25.
- Burstein NA, Law LW. Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice. *Nature*. 1971; 231 (5303): 450-452.
- Busche A, Goldmann T, Naumann U, Steinle A, Brandau S. Natural killer cell-mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic overexpression of major histocompatibility complex class I chain-related gene A. *Hum Gene Ther*. 2006; 17 (2): 135-146.
- Calvo CR, Amsen D, Kruisbeek AM. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor zeta and ZAP70. *J Exp Med*. 1997; 186 (10): 1645-1653.
- Cao B, Tian X, Li Y, Jiang P, Ning T, Xing H, Zhao Y, Zhang C, Shi X, Chen D, Shen Y, Ke Y. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis*. 2005; 26 (7): 1280-1284.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407 (6801): 249-257.
- Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100 (7): 4120-4125.
- Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC-class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (20): 11521-11526.
- Chang C, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist JA, Haude A, Loke YW, King A, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol*. 1999; 163 (9): 4651-4654.
- Chaudhuri S, Cariappa A, Tang M, Bell D, Haber DA, Isselbacher KJ, Finkelstein D, Forcione D, Pillai S. Genetic susceptibility to breast cancer: HLA DQB*03032 and HLA DRB1*11 may represent protective alleles. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2000; 97 (21): 11451-11454.

- Chatzipetrou MA, Tarassi KE, Konstadoulakis MM, Pappas HE, Zafirellis KD, Athanassiades TE, Papadopoulos SA, Panousopoulos DG, Golematis BC, Papasteriades CA. Human leukocyte antigens as genetic markers in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1999; 42 (1): 66-70.
- Cheng L, Zhang SZ, Xiao CY. The A5.1 allele of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A is associated with psoriasis vulgaris in Chinese. *Br J Dermatol*. 2000; 143: 324-329.
- Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996; 77 (7): 1303-1310.
- Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997; 79 (12): 2320-2328.
- Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculation of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*. 1991; 262: 3-11.
- Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol*. 2009; 182 (10): 6121-6128.
- Comiskey M, Warner CM, Shust DJ. MHC molecules of the preimplantation embryo and trophoblast. *Landes Bioscience*, ed. *Madame Curie Bioscience Database*. 2000; NBK6277.
- Concha A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Can the HLA phenotype be used as a prognostic factor in breast carcinomas? *Int J Cancer*. 1991; Suppl 6: 146-154.
- Contu L, Carcassi C, Orrù S, Mulargia M, Arras M, Boero R, Gessa S, Loizedda AL, Lai S, Floris L. HLA-B35 frequency variations correlate with malaria infection in Sardinia. *Tissue Antigens*. 1998; 52 (5): 452-461.
- Colins RW. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet*. 2004; 31 (3): 105-114.
- Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, Van den Merwe PA, Davis SJ. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002; 17 (2): 201-210.
- Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, La Temple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G, Lee WM. Tumor cell responses to IFNgamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*. 1988; 9 (1): 25-34.
- Cresswell P, Arunachalam B, Bangia N, Dick T, Diedrich G, Hughes E, Maric M. Thiol oxidation and reduction in MHC-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Res*. 1999; 19 (2-3): 191-200.
- Cromme FU, Airey J, Heemels MT, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL, Meijer CJ, Walboomers JM. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med*. 1994; 179: 335-340.

- Cui Q, Zhang Y, Su J, Shi C, Lei N, Ding K, Li J, Yu R, Wang L, Wang N. The association between the genetic polymorphisms of LMP2/LMP7 and the outcomes of HCV infection among drug users. *J Biomed Res.* 2010; 24 (5): 374-380.
- Dai D, Che Y, Ru P, Zhou X, Tao J, Ye H, Hong Q, Tang L, Pan G, Lin D, Gong Q, Lv Y, Xu L, Duan S. Significant association between TAP2 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2014; 9: 129.
- Dariavach P, Mattéi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol.* 1988; 18 (12): 1901-1905.
- Darnell RB, DeAngelis LM. Regression of small-cell lung carcinoma in patients with paraneoplastic neuronal antibodies. *Lancet.* 1993; 341 (8836): 21-22.
- Darnell RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93 (10): 4529-4536.
- Darnell RB, Posner JB. Observing the invisible: successful tumor immunity in humans. *Nat Immunol.* 2003; 4 (3): 201.
- Dausset J. Leukoagglutinins IV: leukoagglutinins and blood transfusion. *Vox Sanguinis.* 1954; 4: 190-198.
- Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science.* 1981; 213 (4515): 1469-1474).
- Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity.* 2001; 15 (1): 83-93.
- De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R; EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE-5 –a population –based study. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 23-24.
- De Jong MM, Niens M, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Mulder MJ, van der Steege G, Bruinenberg M, Schaapveld M, Sijmons RH, Hofstra RM, de Vries EG, Kleibeuker JH. The human leukocyte antigen region and colorectal cancer risk. *Dis Colon Rectum.* 2005; 48 (2): 303-306.
- De la Cruz-Merino L, Henao-Carrasco F, García-Manrique T, Fernández-Salguero PM, Codes-Manuel de Villena M. Role of transforming growth factor beta in cancer microenvironment. *Clin Transl Oncol.* 2009; 11 (11): 715-720.
- De la Salle H, Houssaint F, Peyrat MA, Arnold D, Salamero J, Pinczon D, Stevanovic S, Bausinger H, Fricker D, Gomard E, Biddison W, Lehner P, UytdeHaag F, Sasportes M, Donato L, Rammensee HG, Cazenave JP, Hanau D, Tongio MM, Bonneville M. Human peptide transporter deficiency: importance of HLA-B in the presentation of TAP-independent EBV antigens. *J Immunol.* 1997; 158 (10): 4555-4563.

- Deng GY, Muir A, Maclaren NK, She JX. Association of LMP and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Am J Hum Genet.* 1995; 56: 528-534.
- Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart M, Sotiriou C. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend of the molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (16): 5158-5165.
- Dhaghani AS, Amirzargar A, Farjadian F, Ghaderi A. HLA-DQBI alleles and susceptibility to cervical squamous cell carcinoma in Southern Iranian patients. *Pathol Oncol Res.* 2002; 8 (1): 58-61.
- Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature.* 2001; 413 (6852): 165-171.
- Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsia JK, Vivier E, Raulet DH. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus coestimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol.* 2002; 3 (12): 1142-1149.
- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cell expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity.* 1994; 1 (6): 447-456.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002; 298 (5594): 850-854.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3 (11): 991-998.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004a; 21 (2): 137-148.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004b; 22: 329-360.
- Dunn GP, Sheehan KC, Old LJ, Schreiber RD. IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer Res.* 2005; 65 (8): 3447-3453.
- Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol.* 2002; 3 (7): 611-618.
- Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity.* 2002; 16 (1): 23-35.
- Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1909; 5: 273-290.
- Einstein MH, Leanza S, Chiv LG, Schlecht NF, Goldberg GL, Steinberg BM, Burk RD. Genetic variants in TAP are associated with high-grade cervical neoplasia. *Clin Cancer Res.* 2009; 15 (3): 1019-1023.

- Eisen M, Spellman P, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95: 14863.
- Elder GJ, Hersey P, Branley P. Remission of transplanted melanoma—clinical course and tumour cell characterization. *Clin Transplant*. 1997; 11 (6): 565-568.
- Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS*. 1996; 104 (9): 629-639.
- Erfani N, Razmkham M, Talei AR, Pezeshki AM, Doroudhi M, Monabati A, Ghaderi A. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 promoter variants in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006; 165 (2): 114-120.
- Fellerhoff B, Gu S, Laumbacher B, Nerlich AG, Weiss EH, Glass J, Kopp R, Johnson JP, Wank R. The LMP7-K allele of the immunoproteasome exhibits reduced transcript stability and predicts high risk of colon cancer. *Cancer Res*. 2011; 71 (23): 7145-7154.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. 2010. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Flanagan SP. "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*. 1966; 8 (3): 295-309.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4 (4): 330-336.
- Foss FM. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol*. 2002; 29 (3 Suppl 7): 5-11.
- Fraser JH, Rincón M, McCoy KD, Le Gros G. CTLA-4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *Eur J Immunol*. 1999; 29 (3): 838-844.
- Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest*. 2002; 109 (3): 295-299.
- Friese MA, Platten M, Lutz SZ, Naumann U, Aulwurm S, Bischof F, Bühring HJ, Dichgans J, Rammensee HG, Steinle A, Weller M. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res*. 2003; 63 (24): 8996-9006.
- Friese MA, Wischhusen J, Wick W, Weiler M, Eisele G, Steinle A, Weller M. RNA interference targeting transforming growth factor-beta-enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res*. 2004; 64 (20): 7596-7603.
- Furtan D, Carnevali IW, Bernasconi B, Sahnane N, Milani K, Ceritti R, Bertolini V, Chiaravalli AM, Bertoni F, Kwee I, Pastorina R, Carlo C. Hierarchical clustering analysis of pathologic and molecular data identifies prognostically and biologically distinct groups of colorectal carcinomas. *Mod Pathol*. 2011; 24 (1): 126-137.
- Gabe R, Duffy SW. Evaluation of service screening mammography in practice: the impact on breast cancer mortality. *Ann Oncol*. 2005; 16 (2): 153-162.

- Gabrilovich DI, Che HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cell. *Nat Med.* 1996; 2 (10): 1096-1103.
- Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. *Nature.* 2005; 436 (7054): 1186-1190.
- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007; 445 (7129): 771-775.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med.* 2002; 195 (3): 327-333.
- Ghaderi A, Yeganeh F, Kalantari T, Talei AR, Pezeshki AM, Doroudchi M, Dehaghani AS. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 86 (1): 1-7.
- Ghaderi M, Nikitina L, Peacock CS, Hjelmström P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Blackwell JM, Dillner J, Sanjeevi CB. Tumor necrosis factor α -11 and DR15-DQ6 (B*0602) haplotype increase the risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive women in Northern Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9 (10): 1067-1070.
- Ghaderi M, Wallin KL, Wiklund F, Zake LH, Hallmans G, Lenner P, Dillner J, Sanjeevi CB. Risk of invasive cervical cancer associated with polymorphic HLA/DR haplotypes. *Int J Cancer.* 2002; 100 (6): 698-701.
- Ghiringuelli F, Mènard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005; 202 (8): 1075-1085.
- Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol.* 2002; 3 (12): 1150-1155.
- Glick AB. TGFbeta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor. *Cancer Biol Ther.* 2004; 3 (3): 276-283.
- Goepel JR, Rees RC, Rogers K, Stoddard CJ, Thomas WE, Shepherd L. Loss of monomorphic and polymorphic HLA antigens in metastatic breast and colon carcinoma. *Br J Cancer.* 1991; 64 (5): 880-883.
- Gorelik L, Flavell LA. Immune-mediated eradication of tumor through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med.* 2001; 7 (10): 1118-1122.
- Gorelik L, Flavell LA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2 (1): 46-53.
- Goss PE, Ingle JN, Alés-Martínez JE, Cheung AM, Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, et al; NCIC CTG MAP.3 Study Investigators. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2011; 364 (25):2381-91.

- Gourley C, Thornton C, Massie C, Prescott RJ, Turner M, Leonard RC, Kilpatrick DC. Is there a relationship between HLA type and prognostic factors in breast cancer? *Anticancer Res.* 2003; 23 (1B): 633-638.
- Grant GA, Miller JF. Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice. *Nature.* 1965; 205 (976): 1124-1125.
- Graus F, Dalmou J, Reñé R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Viñolas N, García del Muro J, Vadell C, Mason WP, Rosell R, Posner JB, Real FX. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol.* 1997; 15 (8): 2866-2872.
- Gray CW, Slaughter CA, DeMartino GN. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol.* 1994; 236 (1): 7-15.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman H, Beauchamp M, Spies T. Cell stress- regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93 (22): 12445-12450.
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science.* 1998; 279 (5357): 1737-1740.
- Groh V, Rhinehart R, Secrit H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96 (12): 6879-6884.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Coestimulin of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* 2001; 2 (3): 255-260.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002; 419 (6908): 734-738.
- Groh V, Smythe K, Dai Z, Spies T. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol.* 2006; 7 (7): 755-762.
- Hadden JW. The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int J Immunopharmacol.* 1999; 21 (2): 79-101.
- Hakama M, Coleman MP, Alexe DM, Auvinen A. Cancer screening: evidence and practice in Europe 2008. *Eur J Cancer.* 2008; 44 (10): 1404-1413.
- Hammond C, Helenius A. Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7 (4): 523-529.
- Hamsiková E, Sramková I; Loudová M, Ludviková V, Rob L, Vonka V. The frequency of HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in cervical cancer cases in the Czech Republic. *Folia Biol (Praha).* 1999; 45 (1): 31-34.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86 (3): 353-364.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100 (1): 57-70.
- Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattéi MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to

- sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol.* 1991; 147 (3): 1037-1044.
- Hayashi T, Imai K, Morishita Y, et al. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res.* 2006; 66: 563-570.
 - Herberman RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res.* 1978; 27: 305-377.
 - Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 425-479.
 - Hirsch C, Ploegh HL. Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol.* 2000; 10 (7): 268-272.
 - Ho EL, Heusel JW, Brown MG, Matsumoto K, Scalzo AA, Yokoyama WM. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95 (11): 6320-6325.
 - Hodge-Dufour J, Noble PW, Horton MR, Bao C, Wysoka M, Burdick MD, Strieter RM, Trinchieri G, Puré E. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol.* 1997; 59 (5): 2492-2500.
 - Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, Davis T, Henry-Spires R, MacRae S, Willman A, Padera R, Jaklitsch MT, Shankar S, Chen TC, Korman A, Allison JP, Dranoff G. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100 (8): 4712-4717.
 - Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299 (5609): 1057-1061.
 - Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp Med.* 1991; 173 (4): 1017-1020.
 - Hou R, Cao B, Chen Z, Li Y, Ning T et al. Association of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene haplotype with the susceptibility to gastric cancer. *Mol Biol Rep.* 2010. 37: 515-520.
 - Hu L, Liu J, Chen X, Zhang Y, Liu L, Zhu J, Chen J, Shen H, Qiang F, Hu Z. CTLA-4 gene polymorphism +49A/G contributes to genetic susceptibility to two infection-related cancers-hepatocellular carcinoma and cervical cancer. *Hum Immunol.* 2010; 71 (9): 888-891.
 - Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science.* 1994; 264 (5161): 961-965.
 - Huang P, Dong L, Lu X, Zhang Y, Che H, Wang J, Zhang Y, Su J, Yu R. Genetic variants in antigen presentation-related genes influence susceptibility to hepatitis C virus and viral clearance: a case control study. *BMC Infectious Diseases.* 2014; 14: 716.

- He S, Monteiro RC, Berrih-Aknin S, Caillat-Zucman S. Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells. *J Immunol.* 2003; 171 (4): 1909-1917.
- Hunig T. T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunol Today.* 1983; 4 (3): 84-87.
- Iida T, Ohno H, Nakaseko C, Sakuma M, Takeda-Ezaki M, Arase H, Kominami E, Fujisawa T, Saito T. Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol.* 2000; 165 (9): 5062-5068.
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000; 88 (3): 577-583.
- Ivansson EL, Juko-Pecirep I, Gyllensten UB. Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2010; 116 (3): 544-548.
- Jago CB, Yates J, Cámara NO, Lechler RI, Lombardi G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136 (3): 463-71.
- Jayawardena-Wolf J, Bedelac A. CD1 and lipid antigens: intracellular pathways for antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13 (1): 109-113.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90.
- Johnson PR, Hochstrasser M. SUMO-1: ubiquitin gains weight. *Trends Cell Biol.* 1997; 7 (10): 408-413.
- Kabalak G, Thomas RM, Matin J, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, de Ramon E, Hamsen S, Gross WL, Schnarr S, Zeidler H, Gromnica-Ihle E, Schmidt RE, Witte T. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. *Hum Immunol.* 2010; 71 (1): 74-78.
- Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V, Spies T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumor-associated NKG2D ligands. *Nature.* 2007; 447 (7143): 482-486.
- Kaiser S, Santamaria R, Khamiakova T, Sill M, Theron R, Quintales L, Leisch F, De Troyer E. Biclust: BiCluster Algorithms. R package version 1.2.0. 2015. <http://CRAN.R-project.org/package=biclust>.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95 (13): 7556-7561.
- Khaghanzadeh N, Erfani N, Ghayumi MA, Ghaderi A. CTLA4 gene variations and haplotypes in patients with lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010; 196 (2): 171-174.
- Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002; 3 (11): 999-1005.
- Klein G. Tumor Antigens. *Annu Rev Microbiol.* 1966; 20: 223-252.

- Klein J. Natural History of the Major Hiscompatibility Complex. 1986. 1ª.ed. New York: Wiley: 775.
- Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. Immunogenetics. 1999; 49 (7-8): 620-628.
- Koopmann JO, Hämmerling GJ, Momburg F. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. Curr Opin Immunol. 1997; 9 (1): 80-88.
- Krämer U, Illig T, Grune T, Krutmann J, Esser C. Strong association of psoriasis with antigen processing LMP and transport genes TAP differ by gender and phenotype. Genes and Immunity. 2007; 8: 513-517.
- Krushevskaya D, Peterson H, Reimand J, Kull M, Vilo J. VisHIC-Hierarchical functional enrichment analysis of microarray data. Nucleic Acids Res. 2009; 37 (Suppl): 587-592.
- Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Detective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1- null cells due to low constitutive levels of caspases. Science. 1997; 278 (5343): 1630-1632.
- Kwon ED, Foster BA, Hurwitz AA, Medias C, Allison JP, Greenberg NM, Burg MB. Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96 (26): 15074-15079.
- Ladoire S, Mignot G, Dalban C, Chevriaux A, Arnould L, Rébé C, Apetoh L, Boidot R, Penault-Llorca F, Fumoleau P, Roché H, Spielmann M, Levy C, Lortholary A, Eichler F, Mesleard C, Bonnetain F, Ghiringuelli F. FOXP3 expression in cancer cells and anthracyclines efficacy in patients with primary breast cancer treated with adjuvant chemotherapy in the phase III UNICANCER-PAC S 01 trial. Ann Oncol. 2012; 23 (10): 2552-2561.
- Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, Simonetti J, Mannoni P, Mawas C, Olive D. Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. Immunogenetics. 1990; 31 (3): 198-201.
- Lankat-Buttgereit B, Tempé R. The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. FEBS Lett. 1999; 464 (3): 108-112.
- Lavado R, Benavides M, Villar E, Ales I, Alonso A, Caballero A. The HLA-B7 allele confers susceptibility to breast cancer in Spanish women. Immunol Lett. 2005; 101 (2): 223-225.
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science. 1996; 271 (5256): 1734-1736.
- Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. J Immunol. 2004; 172 (12): 7335-7340.
- Lee JE, Lowy AM, Thompson WA, Loflin PT, Skibber JM, Evans DB, Curley SA, Mansfield PF, Reveille JD. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB10301. Gastroenterology. 1996; 111 (2): 426-432.

- Lee YH, Harley JB, Nath SK. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet.* 2005; 116 (5): 361-367.
- Leelayuwat C, Townend DC, Degli-Esposti MA, Abraham LJ, Dawkins RL. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics.* 1994; 40 (5): 339-351.
- Lenschow DJ, Su GH, Duckerman LA, Nabavi V, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90 (23): 11054-11058.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998; 396 (6712): 643-649.
- Li H, Fu ZK, Wang LH, Li DL, Wu N, Zhang J, Li DJ. Association of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms with susceptibility to breast cancer. *Xi Bao Yu Fen Mian Yi Xue Za Zhi.* 2008; 24 (3): 282-284.
- Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity.* 1999; 10 (5): 577-584.
- Li Z, Menoret A, Srivastana P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14 (1): 45-51.
- Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun.* 2001; 2 (3): 145-152.
- Lindenberg P, Walter H, Zöckler H. Association of major histocompatibility complex antigens (HLA antigens) and breast carcinoma. *Anthropol Anz.* 1986; 44 (4): 335-340.
- Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Sharpe AH, Gray GS, Collins M. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics.* 1999; 60 (3): 341-355.
- Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 1991; 174 (3): 561-569.
- Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity.* 1994; 1 (9): 793-801.
- Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity.* 1996; 4 (6): 535-543.
- Liu J, Song B, Wang T, Liu Y, Hao J et al. Genetic variations in CTLA-4, TNF-alpha and LTA and susceptibility to T-cell lymphoma in a Chinese population. *Cancer Epidemiol.* 2013. 37 (6): 930-934.
- Liu W, Wang T, Chen S, Tang A. Hierarchical clustering of gene expression data with divergence measure in 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2009. Beijing: IEEE, 2009: 1-3.
- Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991; 51 (12): 3075-3079.

- Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutation and cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100 (3): 776-781.
- Long EO. Versatile signaling through NKG2D. Nat Immunol. 2002; 3 (12): 1119-1120.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D. MICA-A5.1 is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. Immunogenetics. 2002; 53: 989-991.
- Luster AD, Leder P. IP-10, a –C-X-C – chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. J Exp Med. 1993; 178 (3): 1057-1065.
- Ma JJ, Nishimura M, Mine H, Saji H, Ohta M, Saida K, Ozawa K, Kawakami H, Saida T, Uchiyama T. HLA-DRB1 and tumor necrosis factor gene polymorphisms in Japanese patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1998; 92 (1-2): 109-112.
- Ma S, Yong C, Tang R, Xu Z, Zhang Z, Wang Y, Zhang J, Yang L. Association between LMP2 and LMP7 genes polymorphisms and the risk of gastric cancer: a case-control study. Oncology Letters. 2015; 10: 509-517.
- Macalli C, Nonaka D, Piris A, Pende D, Rivoltini L, Castelli C, Parmiani G. NKG2D-mediated antitumor activity by tumor-infiltrating lymphocytes and antigen-specific T-cell clones isolated from melanoma patients. Clin Cancer Res. 2007; 13 (24): 7458-7468.
- Mackie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. N Engl J Med. 2003; 348 (6): 567-568.
- Macleod K. Tumor suppressor genes. Curr Opin Genet Dev. 2000; 10 (1): 81-93.
- Madeira SC, Oliveira AL. Biclustering algorithms for biological data analysis: A survey. IEEE/ACM. Trans Comput Biol Bioinform. 2004; 1 (1): 24-45.
- Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, Schwartz SM, Daling JR, Smith AG, Nelson JL, Porter P, Shera KA, McDougall JK, Galloway DA. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. J Infect Dis. 2002; 186 (11): 1565-1574.
- Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well established risk factors. J Natl Cancer Inst. 1995; 87 (22): 1681-1685.
- Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K. Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.0.3. 2015.
- Maeurer MJ, Martin DM, Storkus WJ, Lotze MT. TCR usage in CTLs recognizing melanoma/melanocyte antigens. Immunol Today. 1995; 16: 603-604.
- Marín R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Méndez R, Jiménez P, Geraghty DE, Garrido F. Analysis of HLA-E expression in human tumors. Immunogenetics. 2003; 54 (11): 767-775.
- Martinez CK, Monaco JJ. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. Nature. 1991; 353 (6345): 664-667.
- Masunuru K, Darnell RB. Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-binding proteins and signaling proteins in neuronal degeneration. Annu Rev Neurosci. 2001; 24: 239-262.

- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 991-1045.
- Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat.* 1944; 78 (5): 176-199.
- Meleckar JR, Sherman LA. The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol.* 1987; 138 (11): 3873-3876.
- Melián A, Beckman EM, Porcelli SA, Brenner MB. Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class I-like molecules. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8 (1): 82-88.
- Mendoza Rincon FJ. Human MICA and MICB genes: Their biological function and relevance to infection and cáncer. In *Advances In Cancer Research al UNAM.* J Mass Oliva Ed. Manual Moderno. 2007; P328.
- Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, Tagliabue E, Balsari A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (11): 1746-1752.
- Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest.* 1996; 74 (1): 43-47.
- Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategia en cáncer del Sistema Nacional de Salud. Madrid. 2010.
- Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamakazi M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H. Triple repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94 (4): 1298-1303.
- Molinero LL, Marcos CY, Mirbaha F, Fainboim L, Stastny P, Zwirner NW. Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur J Immunogenet.* 2002; 29 (4): 315-319.
- Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, Zwirner NW. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol.* 2004; 173 (9): 5583-5590.
- Monaco JJ, McDevitt HO. The LMP antigens: a stable MHC-controlled multisubunit protein complex. *Hum Immunol.* 1986; 15 (4): 416-426.
- Monaco JJ. Genes in the MHC that may affect antigen processing. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4 (1): 70-73.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 197-223.
- Moretta L, Ciccone E, Mingari MC. Human natural killer cell: origin, clonality, specificity and receptors. *Advances in Immunology.* 1994; 55: 341-381.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 1205-1211.

- Moser JM, Byers AM, Lukacher AE. NK cell receptors in antiviral immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14 (4): 509-516.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T-cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58 (16): 3491-3494.
- Nandi D, Jiang H, Mocaco JJ. Identification of MELC-1 (LMP10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol.* 1996; 156 (7): 2361-2364.
- Nawa A, Nishiyama Y, Kobayashi T, Wakahara Y, Okamoto F, Suganuma N, Goto S, Kuzuya K, Tomoda Y. Association of human leukocyte antigen B1*03 with cervical cancer in Japanese women age 35 years and younger. *Cancer.* 1995; 72: 518-521.
- Nikkilä J, Törönen P, Kaski S, Venna J, Castrén E et al. Analysis and visualization of gene expression data using self-organizing maps. *Neural Networks.* 2002; 15: 953-966.
- Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 2010; 127 (4): 759-767.
- Noble JA, Martin A, Valdes AM, Lane JA, Galgani A, Petrone A, Lorini R, Peozzilli P, Buzzetti R, Erlich HA. Type 1 diabetes risk for human leukocyte antigen (HLA)-DR3 haplotypes depends of genotypic context: association of DPB1 and HLA class I loci among DR3- and DR4-matched Italian patients and controls. *Hum Immunol.* 2008; 69 (4-5): 291-300.
- Nomoto K, Takeya K. Immunology properties of methylcholanthrene-induced sarcomas of neonatally thymectomized mice. *J Natl Cancer Inst.* 1969; 42 (3): 445-453.
- Old LJ, Boyse EA. Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med.* 1964; 15: 167-186.
- Olsson C, Riesbeck K, Dohlsten M, Michaëlsson E. CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cells blasts. *J Biol chem.* 274 (20): 14400-14405.
- O'Mahony D, Morris JC, Quinn C, Gao W, Wilson WH, Gause B, Pittaluga S, Neelapu S, Brown M, Fleisher TH, Gulley JL, Schlom J, Nussenblatt R, Albert P, Davis TA, Lowy I, Petrus M, Waldmann TA, Janik JE. A pilot study of CTLA-4 blockade after cancer vaccine failure in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (3): 958-964.
- Ortiz-Navarrete V, Seelig A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hämmerling GJ. Subunit of the "20S" proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature.* 1991; 353 (6345): 662-664.
- Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N, Ando H, Furihata K, Ono S, Pivetti-Pezzi P, Tabbara KF, Palimeri GD, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Geng Z, Bahram S, Inoko H. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Norther Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens.* 1997; 49 (5): 448-454.

- Ozbas-Gerceker F, Bozman N, Gezici S, Pehlivan M, Yilmaz S, Oguzkan-Balci S. Association of TAP1 and TAP2 genes polymorphisms with hematological malignancies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14 (9): 5213-5217.
- Ozbas-Gerceker F, Bozman N, Kok S, Pehlivan M, Yilmaz M, Pehlivan S, Oguzkan-Balci S. Association of an LMP2 polymorphism with acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14 (11): 6399-6402.
- Payne R, Folfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest*. 1958; 37 (12): 1756-1763.
- Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I—restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 323-358.
- Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*. 1968; 217 (5126): 370-371.
- Papazahariadou M, Athanasiadis GI, Papadopoulos E. Involvement of NK cells against tumors and parasites. *Int J Biol Markers*. 2007; 22 (2): 144-153.
- Parker JS, Mullins M, Cheang M, Leung S, Voduc K, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou C, Bernard P. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1160-1167.
- Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcerano S, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A, Moretta L. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*. 2001; 31 (4): 1076-1086.
- Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res*. 2002; 62 (21): 6178-6186.
- Penn I, Starzl TE. Malignant lymphomas in transplantation patients: a review of the world experience. *Int Z Klin Pharmakol Ther Toxikol*. 1970; 3 (1): 49-54.
- Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation*. 1996; 61 (2): 274-278.
- Pérez-Díez A, Marincola FM. Immunotherapy against antigenic tumors: a game with a lot of players. *Cell Moll Life Sci*. 2002; 59 (2): 230-240.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406 (6797): 747-752.
- Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related chain MIC-A gene. *Immunogenetics*. 1999; 49 (7-8): 605-612.
- Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schawartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, Duray PH, Steinberg

- SM, Allison JP, Davis TA, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100 (14): 8372-8377.
- Pioli C, Gatta L, Ubaldi V, Doria G. Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. *J Immunol*. 2000; 165 (10): 5530-5536.
 - Piotrowski P, Lianeri M, Olesinska M, Jagodzinski PP. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*. 2012; 39 (2): 1343-1347.
 - Powis SJ, Townsend AR, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*. 1991; 354 (6354): 528-531.
 - Puré E, Allison JP, Schreiber RD. Breaking down the barriers to cancer immunotherapy. *Nat Immunol*. 2005; 6 (12): 1207-1210.
 - Qin Z, Blankenstein T. CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent of IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. 2000; 12 (6): 677-686.
 - Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25: 267-296.
 - Rahimifar S, Erfani N, Sarraf Z, Ghaderi A. Ctl4-4 gene variations may influence cervical cancer susceptibility. *Gynecol Oncol*. 2010; 119 (1): 136-139.
 - Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 781-790.
 - Restifo NP, Antony PA, Finkelstein SE, Leitner WW, Surman DP, Theoret MR, Touloukian CE. Assumptions of the tumor "escape" hypothesis. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12 (1): 81-86.
 - Rygaard J, Povlsen CO. Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation*. 1974a; 17 (1): 135-136.
 - Rygaard J, Povlsen CO. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumors. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1974; 82 (19): 99-106.
 - Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, Jabri B. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol*. 2001; 167 (10): 5527-5530.
 - Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994; 78 (5): 761-771.
 - Rody A, Holtrich U, Pusztai L, Liedtke C, Gaetje R, Ruckhaeberle E, Solbach C, Hanker L, Ahr A, Metzler D, Engels K, Karn T, Kaufmann M. T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and Her2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2009; 11 (2): R15.

- Röle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M, Odeberg J, Söderbeg-Nauclér C, Cosman D, Kärre K, Cerboni C. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol.* 2003; 171 (2): 902-908.
- Roszak A, Lianeri M, Jagodzinski PP. Prevalence of NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012; 16 (8): 841-845.
- Rouas-Freiss N, Bruel S, Menier C, Marcou C, Moreau P, Carosella ED. Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. *Int J Cancer.* 2005; 117 (1): 114-122.
- Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3 (7): 544-556.
- Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 323-370.
- Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for the calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* 1996; 5 (2): 103-114.
- Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol.* 2002; 169 (8): 4098-4102.
- Schlösstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 1973; 288 (14): 704-706.
- Schneider H, Martin M, Agarraberes FA, Yin L, Rapoport I, Kirchhausen T, Rudd CE. Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J Immunol.* 1999; 163 (4): 1868-1879.
- Schopper D, de Wolf C. How effective are breast cancer screening programmes by mammography? Review of the current evidence. *Eur J Cancer.* 2009; 45 (11): 1916-1923.
- Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001; 61 (10): 3932-3936.
- Seliger B, Hohne A, Knuth A, Bernhard H, Ehring B, Tampe R, Huber C. Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res.* 1996; 2: 1427-1433.
- Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Tap off—tumors on. *Immunol Today.* 1997; 18 (6): 292-299.
- Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013; 24 (6): vi7-vi23.
- SEOM. Las cifras del cancer en España. 2014. Singh Bhatia. Blockcluster: Coclustering Package for Binary, Categorical, Contingency and Continuous Data-Sets. R package version 4.0.2. 2015. <http://CRAN.R-project.org/package=blockcluster>.

- Serge Iovleff and Parmeet
- Sfondrini L, Balsari A, Ménard S. Innate immunity in breast carcinoma. *Cancer*. 2003; 10: 301-308.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001; 410 (6832): 1107-1111.
- Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2 (2): 116-126.
- Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell*. 2000; 5 (2): 403-410.
- Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, Nakaseko C, Isono K, Bonifacio JS, Saito T. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity*. 1997; 6 (5): 583-589.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DJ, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med*. 2000; 192 (5): 755-760.
- Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. NKT cells- conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol*. 2002; 14 (2): 165-171.
- Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med*. 2005; 202 (5): 583-588.
- Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer Immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006; 90: 1-50.
- Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol*. 2006; 176 (3): 1582-1587.
- Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet*. 1948; 49 (2): 87-108.
- Song L, Ma N, Han L, Yan H, Yan B, Yuan Z, Cao B. Association between LMP2/LMP7 genetic variability and the metastasis risk of ovarian cancer in Chinese women in Beijing. *Human Immunology*. 2014; 75: 239-244.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 98 (19): 10869-10874.
- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science*. 1989; 243 (4888): 214-217.
- Spies T, DeMars R. Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature*. 1991; 351 (6324): 323-324.

- Spies T. Relevance of NKG2D and its ligands in tumor immunity. *Cancer Immunity*. 2005; 5: 10-12.
- Spiotto MT, Rowley DA, Schreiber H. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat Med*. 2004; 10 (3): 294-298.
- Srivastana P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 395-425.
- Staaf J, Ringnér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Bendahl PO, Holm K, Arason A, Gunnarsson BA, Hegardt C, Agnarsson BA, Luts L, Grabau D, Fernö M, Malmström PO, Johannsson OT, Loman N, Barkardottir RB, Borg A. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2—positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (11): 1813-1820.
- Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, Erbe DV, Ikemizu S, Davis SJ, Stahl ML, Seehra J, Somers WS, Mosyak L. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature*. 2001; 410 (6828): 608-611.
- Stein MN, Shin J, Gudnowaty O, Bernstein AM, Liu JM. Antibody-dependent cell cytotoxicity to breast cancer targets despite inhibitory kir signaling. *Anticancer Res*. 2006; 26 (3A): 1759-1763).
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516.
- Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth and metastasis. *Blood*. 2001; 97 (1): 192-197.
- Stuebe AM, Willett WC, Xue F, Michels KB. Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Arch Intern Med*. 2009; 169 (15):1364.
- Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974; 183 (4124): 534-536.
- Stutman O. Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res*. 1975; 22: 261-422.
- Stutman O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous mating and heterozygous mating and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst*. 1979; 62 (2): 353-358.
- Subirá ML, Crisci CD, Zornoza G, Sanz ML, Voltas J, Hernández JL, Oehling A. Breast cancer and histocompatibility antigens. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1979; 7 (6): 411-416.
- Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99 (5): 2971-2976.
- Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, Shi Y, Yao J, Guo Y, Yu D, Tian T, Zhou X, Shen H, Lin D. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. *Cancer Res*. 2008; 68 (17): 7025-7034.

- Suranyi MG, Hogan PG, Falk MC, Axelsen RA, Rigby R, Hawley C, Petrie J. Advanced donor-origin melanoma in a renal transplanted recipient: immunotherapy, cure, and retransplantation. *Transplantation*. 1998; 66 (5): 655-661.
- Svane IM, Engel AM, Nielsen MB, Ljunggren HG, Rygaard J, Werdelin O. Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur J Immunol*. 1996; 26 (8): 1844-1850.
- Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007; 117 (5): 1137-1146.
- Tamaki S, Sanefuzi N, Oui K. An association between the MICA-A5.1 allele and an increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36: 351-356.
- Tanay A, Sharan R, Shamir R. Discovering statistically significant biclustering in gene expression data. *Bioinformatics*. 2002; 18 (Suppl 1): 136-144.
- Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 65-97.
- Thomas L. In cellular and humoral aspect of the hypersensitive states. (ed. Lawrence, H.S.). 1959; 529-532. (Hoeber-Harper, New York).
- Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982; 55 (3-4): 329-333.
- Thompson RH, Allison JP, Kwon ED. Anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Urol Oncol*. 2006; 24 (5): 442-447.
- Tieng V, Le Bouguénec C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, Charron D, Toubert A. Binding of *Escherichia coli* adhesion AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99 (5): 2977-2982.
- Tothill R, Tinker A, George J, Brown R, Fox S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14: 5198-5208.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyannanthan R, Tuomilehto-Wolf E, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003; 423 (6939): 506-511.
- Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, Vitetta ES. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med*. 1997; 3 (5): 505-509.
- Van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 1996; 184 (5): 1781-1790.

- Van der Merwe PA, Davis SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 659-684.
- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell*. 1992; 71 (7): 1205-1214.
- Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*. 1958; 181 (4625): 1735-1736.
- Van Rood JJ. Leucocyte groups, the normal lymphocyte transfer test and homograft sensitivity. En: *Histocompatibility testing*. Copenhagen Munksgaardmp. 1965; 37.
- Van Rood JJ. A proposal for international cooperation in organ transplantation: Eurotransplant. En: *Histocompatibility testing*. Baltimore Williamsand Wilkins. 1967; p451.
- Vandenberghe P, Van Gool SW, Karsan A, Ceuppens JL, Boogaerts MA, Vandenberghe P. Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. *Immunology*. 1999; 98 (3): 413-421.
- Verma R, Deshaies RJ. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell*. 2000; 101 (4): 341-344.
- Vetter CS, Groh V, Straten P, Spies T, Bröcker EB, Becker JC. *J Invest Dermatol*. 2002; 118 (4): 600-605.
- Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13 (2): 143-154.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8 (7): 523-532.
- Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñi M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 35 (1): 23-28.
- Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol*. 2002; 14 (3): 306-311.
- Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 2004; 306 (5701): 1517-1519.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (8): 594-604.
- Wahl SM, Wen J, Moutsopoulos N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev*. 2006; 213: 213-227.
- Walker LE, Reisfeld RA. Human histocompatibility antigens: isolation and chemical characterization. *J Immunol Methods*. 1982; 49 (3): R25-50.
- Wang L, Li D, Fu Z, Li H, Jiang W, Li D. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han population. *BMC Cancer*. 2007; 7: 173.
- Wang YK, Print CG, Carmpin EJ. Biclustering reveals breast cancer tumour subgroups with common clinical features and improves prediction of disease recurrence. *BMC genomics*. 2013; 14: 102.

- Ward S, Casey D, Labarthe MC, Whelan M, Dalglish A, Pandha H, Todryk S. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2002; 51 (7): 351-357.
- Wheelock EF, Weinhold KJ, Levich J. The tumor dormant state. *Adv Cancer Res.* 1981; 34: 107-140.
- Wiemann K, Mittrücker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T, Rammensee HG, Steinle A. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol.* 2005; 175 (2): 720-729.
- Wischhusen J, Waschbisch A, Wiendl H. Immune-refractory cancers and their little helpers—an extended role for immunetolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? *Semin Cancer Biol.* 2007; 17 (6): 459-468.
- Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND, Edmondson S, Devenish RJ, Ralph SJ. Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem.* 1997; 272 (45): 28779-28785.
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by KNG2D and DAP10. *Science.* 1999; 285 (5428): 730-732.
- Wu J, Chalupny NJ, Manley TJ, Riddell SR, Cosman D, Spies T. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J Immunol.* 2003; 170 (8): 4196-4200.
- Wu Y, Liu B, Lin W, Xu Y, Li L, Zhang Y, chen S, Lin Z, Xu A. Human leukocyte antigen class II alleles and risk of cervical cancer in China. *Hum Immunol.* 2007; 68 (3): 192-200.
- Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1526 (1): 10-12.
- Yan Q, Chen P, Lu A, Zhao P, Gu A. Association between CTLA-4 60 G/A and -1661 A/G polymorphisms and the risk of cancers: a meta-analysis. *Plos One.* 2013; 8 (12): e83710.
- Yewdell JW, Hill AB. Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol.* 2002; 3 (11): 1019-1025.
- York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev.* 1999; 172: 49-66.
- Zhang L, Conejo-García JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (3): 203-213.
- Zheng J, Yu X, Jiang L, Xiao M, Bai B, Lu J, Zhou Y. Association between the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 +49 G>A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2010; 10: 522.
- Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007; 445 (7130): 936-940.

- Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic or semiallogenic system. *Nature*. 1974; 248 (5450): 701-702.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6 (10): 715-727.
- Zou N, Yang L, Chen L, Li T, Jin T, Peng H, Zhang S, Wang D, Li R, Liv C, Jiang J, Wang L, Liang W, Hu J, Li S, Wu C, Cui X, Chen Y, Li F. Heterozygote of TAP1 codon 637 decreases susceptibility to HPV infection but increases susceptibility to esophageal cancer among the Kazakh populations. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015; 34: 70.
- Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J immunol*. 2005; 174 (5): 3098-3104.
- Zwirner NW, Fernández-Viña MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics*. 1998; 47 (2): 139-148.
- Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LL. Immunobiology of the human MHC class I chain-related gene A (MICA): from transplantation to tumor immune scape. *Inmunología*. 2000; 25: 25-38.

IX. ANEXOS

ANEXO 1: DATOS DE FILIACIÓN Y VARIABLES CLÍNICAS:

1. DATOS DE FILIACIÓN.
2. HOSPITAL DE PROCEDENCIA: Hospital Regional Universitario de Málaga, Hospital Comarcal de Antequera, Hospital Comarcal de Vélez Málaga, Hospital Costa del Sol.
3. FECHA DE NACIMIENTO.
4. FECHA DE DIAGNÓSTICO.
5. EDAD AL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA.
6. ESTADO HORMONAL AL DIAGNÓSTICO: premenopáusica, perimenopáusica y posmenopáusica.
7. ENFERMEDAD BILATERAL AL DIAGNÓSTICO: sí o no.
8. TIPO HISTOLÓGICO: in situ, ductal infiltrante, lobulillar infiltrante y mixto.
9. GRADO HISTOLÓGICO: GH1, GH2, GH3, no conocido.
10. TAMAÑO DEL TUMOR: T0 (TIS), T1, T2, T3, T4.
11. AFECTACIÓN GANGLIONAR: Nx, N0, N1, N2, N3.
12. AFECTACIÓN METASTÁTICA: M0, M1.
13. ESTADIO ENFERMEDAD: 0 (TIS), I, II, III, IV.
14. NÚMERO DE LOCALIZACIONES METASTÁSICAS AL DIAGNÓSTICO: 0, 1, 2, 3, 4 > 4.
15. ENFERMEDAD METASTÁTICA VISCERAL: sí o no.
16. EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES: sí o no.
17. CEB-2: + negativo, ++ fish negativo, ++ fish positivo, +++, desconocido.
18. P53: (%).
19. Ki67: (%).
20. TRIPLE NEGATIVO: sí o no.
21. SUBTIPO MOLECULAR: luminal A, luminal B Her2-, luminal B Her2+, Her2, triple negativo.
22. ANTECEDENTES FAMILIARES CM: sí o no.
23. ESTADO BRCA1: no estudiado, no mutación encontrada, mutación conocida.
24. ESTADO BRCA2: no estudiado, no mutación encontrada, mutación conocida.
25. TIPO DE CIRUGÍA: no cirugía, conservadora + GC, conservadora + VC, mastectomía + GC, mastectomía + VA, otras.
26. ADMINISTRACIÓN DE QUIMIOTERAPIA: sí o no.
27. TIPO DE QUIMIOTERAPIA: neoadyuvante, adyuvante o paliativa.
28. ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA: antraciclinas, antraciclinas + taxanos, antraciclinas + trastuzumab, antraciclinas + taxanos + trastuzumab, otras.
29. ADMINISTRACIÓN DE HORMONOTERAPIA: sí o no.
30. TIPO DE HORMONOTERAPIA: neoadyuvante, adyuvante o paliativa.
31. ESQUEMA DE HORMONOTERAPIA: tamoxifeno, inhibidor de aromatasa, secuencial: Tam-IA, secuencial: IA-Tam, otras.
32. ADMINISTRACIÓN DE RADIOTERAPIA: sí o no.
33. TIPO DE RADIOTERAPIA: adyuvante o paliativa.

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

- 34. ESTADO DE SEGUIMIENTO (a 1, 2, 3, 4 y 5 años): no conocido, vivo sin enfermedad, vivo con enfermedad, fallecido.
- 35. ESTADO DE PROGRESIÓN (a 1, 2, 3, 4 y 5 años): no conocido, ausencia de progresión, progresión de enfermedad, fallecido.
- 36. FECHA DE RECAÍDA / PROGRESIÓN.
- 37. EVENTO RECAÍDA / PROGRESIÓN: sí o no.
- 38. FECHA DE ÉXITUS.

ANEXO 2: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO:

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título del proyecto: Susceptibilidad y protección conferida por el polimorfismo inmunogenético en el cáncer de mama esporádico.

Centros que participan: Hospital Regional Universitario de Málaga, Hospital Comarcal de Antequera, Hospital Comarcal de Vélez Málaga, Hospital Costa del Sol.

Quisiéramos solicitar su colaboración para participar en un proyecto cuyo objetivo es estudiar el polimorfismo (variaciones) de determinados genes del sistema inmunológico en relación con el cáncer de mama esporádico (no hereditario). Este estudio está promovido por la Sección de Oncología Médica y el Servicio de Inmunología del Hospital Carlos Haya y por la Fundación IMABIS. Para ello vamos a pedir la participación de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama (en su caso) y también la colaboración de personas que no tengan esta enfermedad.

¿Qué significa participar? Objetivos.

A los pacientes que acepten participar y firmen el consentimiento informado se les realizará una breve entrevista para tomar datos sobre su enfermedad, se recogerán datos de la historia clínica y se les extraerá una muestra de sangre (15 ml). Esta muestra, debidamente procesada, y los datos, debidamente desvinculados de su identidad, formarán parte de un Banco de muestras biológicas para ser utilizados en proyectos científicos, sin ánimo de lucro, con el objetivo de determinar la posible implicación del sistema inmunológico del paciente en el cáncer de mama. El equipo investigador garantiza que en todo momento se aplicarán las leyes y normativas referentes a los aspectos éticos y de protección de datos de carácter personal.

¿Qué pasa si no participa?

Implicación de perfiles inmuno-genéticos de la respuesta inmune citotóxica en la susceptibilidad y/o evolución de pacientes con cáncer de mama del Sur de España

La participación es estrictamente VOLUNTARIA. En caso de participar, pueden pedir la retirada de su muestra en cualquier momento y sin dar explicaciones. La atención médica que recibe no se verá afectada en ningún momento por su decisión de participar o no en el proyecto.

¿Cuáles son los beneficios y riesgos de participar?

No se espera que los resultados a corto plazo de este proyecto aporten un beneficio individual a los participantes, pero sí se espera que los resultados ayuden en un futuro a pacientes con la misma enfermedad que tiene usted. Los riesgos de la extracción de sangre son mínimos, sin embargo pueden aparecer leves molestias en la zona del pinchazo, como dolor o sangrado.

¿Cómo van a garantizar la confidencialidad de la información?

Todos los datos recogidos en este proyecto serán registrados de forma anónima, siguiendo estrictamente las leyes y normas de protección de datos en vigor (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre).

Con el fin de proteger la confidencialidad de la información personal de los participantes se han tomado las siguientes medidas:

- ❑ Todos los datos que puedan identificar al participante se mantendrán separados del resto de la información recogida en los diferentes cuestionarios del estudio.

- ❑ Cada caso del estudio contará con un número de identificación que será el que figure en las bases de datos
- ❑ El análisis de la información se hará siempre de forma agregada y nunca individual
- ❑ Todos los investigadores implicados en el proyecto se comprometen a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información facilitada por los participantes
- ❑ Los datos personales se desvincularán permanentemente de los datos clínicos y de los datos genéticos con el fin de proteger la identidad de los participantes (método de anonimización de los datos)
- ❑ Todas las bases de datos del proyecto estarán protegidas electrónicamente con códigos que limiten el acceso únicamente a los investigadores del proyecto

COPIA PARA EL PACIENTE

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El Sr./Sra.....

Declara haber sido informado/a sobre el proyecto: *Susceptibilidad y protección conferida por el polimorfismo inmunogenético en el cáncer de mama esporádico.*

- ☐ Que tiene por objetivo tomar una muestra de sangre de pacientes con cáncer de mama de la provincia de Málaga, así como de personas sin esta enfermedad, para estudiar genes del sistema inmunológico que pudieran estar implicados en susceptibilidad o protección frente a la enfermedad.
- ☐ Que es promovido por la Sección de Oncología Médica y el Servicio de Inmunología del Hospital Regional Universitario de Málaga, así como por la Fundación IMABIS.
- ☐ Que he sido informado convenientemente de las condiciones de mi participación.
- ☐ Que mi participación es totalmente voluntaria y puedo retirarme del estudio en cualquier momento y sin dar explicaciones. Accedo a someterme a los procedimientos y a aportar la información necesaria al médico o al personal del equipo de investigación, cuando se me solicite.
- ☐ Que he recibido una copia del formulario de información al paciente y consentimiento informado a fin de que obre en mi poder.

Firma del participante	Firma del representante legal (en caso necesario)
Fecha: de del	

Nombre y firma de la persona responsable de la obtención el consentimiento

Fecha: de del

Nombre y apellidos del investigador	
Firma	
Institución	HRU de Málaga

COPIA PARA LA HISTORIA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El Sr./Sra.....

Declara haber sido informado/a sobre el proyecto: *Susceptibilidad y protección conferida por el polimorfismo inmunogenético en el cáncer de mama esporádico.*

- ☐ Que tiene por objetivo tomar una muestra de sangre de pacientes con cáncer de mama de la provincia de Málaga, así como de personas sin esta enfermedad, para estudiar genes del sistema inmunológico que pudieran estar implicados en susceptibilidad o protección frente a la enfermedad.
- ☐ Que es promovido por la Sección de Oncología Médica y el Servicio de Inmunología del Hospital Regional Universitario de Málaga, así como por la Fundación IMABIS.
- ☐ Que he sido informado convenientemente de las condiciones de mi participación.
- ☐ Que mi participación es totalmente voluntaria y puedo retirarme del estudio en cualquier momento y sin dar explicaciones. Accedo a someterme a los procedimientos y a aportar la información necesaria al médico o al personal del equipo de investigación, cuando se me solicite.
- ☐ Que he recibido una copia del formulario de información al paciente y consentimiento informado a fin de que obre en mi poder.

Firma del participante	Firma del representante legal (en caso necesario)
Fecha: de del	

Nombre y firma de la persona responsable de la obtención el consentimiento

Fecha: de del

Nombre y apellidos del investigador	
Firma	
Institución	HRU de Málaga

